



MD/EP 3781561 T2 2025.02.28

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) MD/EP 3781561 (13)
MOD

(51) Int. Cl: C07D 405/14 (2006.01.01)
C07D 405/12 (2006.01.01)
A61K 31/44 (2006.01.01)
A61P 35/00 (2006.01.01)

(12) BREVET DE INVENȚIE EUROPEAN VALIDAT

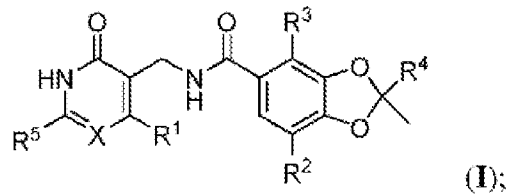
(21) Numărul de depozit: e 2021 0170 (22) Data de depozit: 2019.04.17 (96) Numărul cererii și data de depozit a cererii de brevet european: 19722363.9, 2019.04.17 (97) Numărul de publicare și data publicării de către OEB a cererii de brevet european: 3781561, 2021.02.24 (31) Numărul cererii prioritare: 201862659408 P (32) Data de depozit a cererii prioritare: 2018.04.18 (33) Țara cererii prioritare: US	(49) Data publicării traducerii fasciculului de brevet european validat: BOPI nr. 02/2025, 2025.02.28 (80) Data publicării mențiunii acordării de către OEB: EPB nr. 11/2024, 2024.03.13 (82) Data publicării solicitării de validare a brevetului european: BOPI nr. 03/2021, 2021.03.31
(71) Solicitant: CONSTELLATION PHARMACEUTICALS INC., US (72) Inventatori: CÔTÉ Alexandre, CA; GEHLING Victor S., US; KHANNA Avinash, US; MOINE Ludivine, US; STUCKEY Jacob I., US (73) Titular: CONSTELLATION PHARMACEUTICALS INC., US (74) Mandatar autorizat: CORCODEL Angela	

(54) Modulatori ai enzimelor modificare a metilului, compoziții și utilizări ale acestora

(57) Rezumat:

Sunt furnizați noi compuși cu Formula (I): și sărurile acceptabile farmaceutic ale acestora, care sunt utili pentru tratarea unei varietăți de boli, tulburări sau stări, asociate cu enzimele modificatoare de metil. De asemenea, sunt furnizate compoziții farmaceutice cuprinzând noii compuși cu Formula (I), săruri acceptabile farmaceutic ale acestora și metode pentru utilizarea lor în tratarea uneia sau mai multor boli, tulburări sau stări, asociate cu enzimele modificatoare de metil.

Revendicări: 15



(I);

MD/EP 3781561 T2 2025.02.28

Descriere:**(Descrierea se publică în varianta redactată de titular)****STADIUL TEHNICII**

Cromatina eucariotă este compusă din complexe macromoleculare denumite nucleozomi. Un nucleozom are 147 de perechi de baze de ADN spiralate în jurul unui octamer proteic având două subunități din fiecare dintre proteina histonică H2A, H2B, H3 și H4. Proteinele histonice sunt supuse unor modificări post-tranlaționale care, la rândul lor, afectează structura cromatinei și expresia genelor. Un tip de modificare post-tranlațională realizată asupra histonelor este metilarea reziduurilor de lizină și arginină. Metilarea histonelor joacă un rol critic în reglarea expresiei genelor la eucariote. Metilarea afectează structura cromatinei și a fost legată atât de activarea, cât și de reprimarea transcripției (Zhang și Reinberg, Genes Dev. 15:2343-2360, 2001). Enzimele care catalizează atașarea și îndepărtarea grupărilor metil din histone sunt implicate în silanțare genică, dezvoltarea embrionară, proliferarea celulară și alte procese.

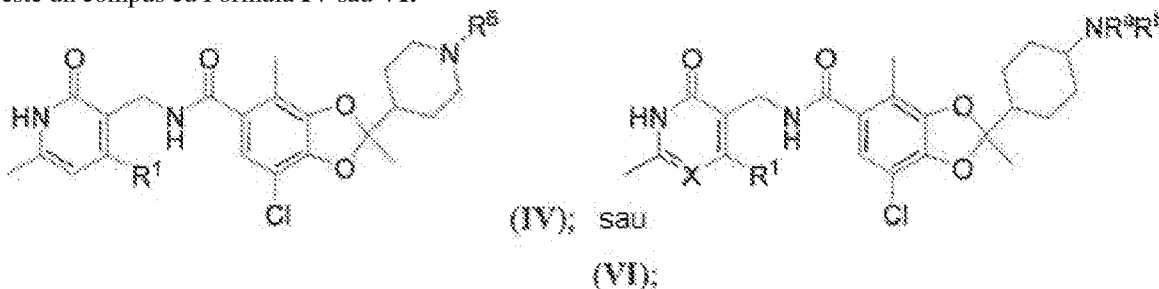
O clasă de histone metilaze este caracterizată prin prezența unui domeniu SET, care cuprinde aproximativ 130 de aminoacizi. EZH2 este un exemplu de domeniu SET uman care conține metilază. EZH2 se asociază cu EED (Embryonic Ectoderm Development) și SUZ12 (supresor al omologului zeste 12) pentru a forma un complex cunoscut sub numele de PRC2 (Polycomb Group Repressive Complex 2) având capacitatea de a trimetila histona H3 la lizina 27 (Cao și Zhang, Mol. Cell 15:57-67, 2004). Complexele PRC2 pot include, de asemenea, subunități RBAP46 și RBAP48. Un alt exemplu este metilaza asociată EZH1.

Activitățile oncogene ale EZH2 au fost demonstrate de o serie de studii în diferite tipuri de cancer. ~15-20% GCB-DLBCL conțin o mutație de creștere a funcției în EZH2 (reziduul Y641) și aceste celule sunt hipersensibile la inhibarea EZH2 atât *in vitro* și *in vivo* (McCabe și colab., 2012; Bradley și colab., 2014). În experimentele cu linii celulare, supraexprimarea EZH2 induce invazia celulară, creșterea în agar moale și motilitatea, în timp ce distrugerea EZH2 inhibă proliferarea și invazia celulară (Kleer și colab., 2003, Proc. Nat. Acad. Sci. SUA 100:11606-11611; Varambally și colab., (2002), "The polycomb group protein EZH2 is involved in progression of prostate cancer", Nature 419, 624-629). S-a demonstrat faptul că EZH2 reprimă expresia mai multor supresori tumorali, inclusiv E-caderină, DAB2IP și RUNX3, printre altele. În modelele de xenogrefă, EZH2 redus prin tehnica knock-down inhibă creșterea tumorii și metastaza. S-a demonstrat faptul că modularea în jos a EZH2 în modelele murine blochează metastaza cancerului de prostată (Min și colab., "An oncogene-tumor suppressor cascade drives metastatic prostate cancer by coordinately activating Ras and nuclear factor- kappaB," Nat Med. martie 2010; 16(3):286-94). Recent, s-a demonstrat faptul că EZH2 este supraexprimat în tumorile neuroendocrine și inhibarea EZH2 în tumorile de șoarece restabilește dependența de androgeni (Ku și colab., Science, 355, 2017). Supraexprimarea EZH2 este asociată cu agresivitatea anumitor tipuri de cancer, cum ar fi cancerul de sân (Kleer și colab., Proc. Nat. Acad. Sci. SUA 100:11606-11611, 2003). Studii recente sugerează, de asemenea, faptul că gena de fuziune oncogenă specifică cancerului de prostată TMPRSS2-ERG induce programe epigenetice represive prin activarea directă a EZH2 (Yu și colab., "An Integrated Network of Androgen Receptor, Polycomb, and TMPRSS2-ERG Gene Fusions in Prostate Cancer Progression", Cancer Cell. 2010 May 18;17(5):443-454). Publicația de cerere de brevet de invenție US2017/0073335 A1 se referă la un compus cu efect inhibitor asupra activității EZH1 și/sau EZH2.

Având în vedere rolul lor în reglarea diverselor procese biologice, enzimele de modificare a metilului, în special EZH2 și formele mutante ale acestuia, sunt ținte atractive pentru modulare.

EXPUNEREA PE SCURT A INVENȚIEI

Invenția revendicată este definită în revendicările anexate. În mod specific, ceea ce se revendică este un compus cu Formula IV sau VI:



sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia, în care:

R¹ este -SCH₃ sau clor;

X este CH;

R^a este hidrogen, (C₁-C₄)alchil sau halo(C₁-C₄)alchil;

R^b este (C₁-C₄)alchil, halo(C₁-C₄)alchil sau heterocicil cu 4-7 membri, în care respectiva grupare heterocicil este opțional substituită cu 1 până la 3 grupări selectate dintre halo, (C₁-C₄)alchil, halo(C₁-C₄)alchil, (C₁-C₄)alcoxi și halo(C₁-C₄)alcoxi; sau

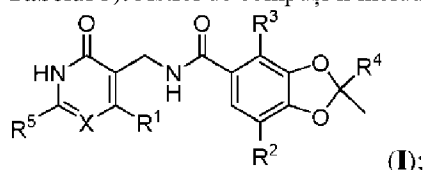
R^a și R^b împreună cu atomul de azot la care sunt atașați formează un heterocicil cu 4-7 membri opțional substituit cu 1 până la 3 grupări selectate dintre halogen, (C₁-C₄)alchil, halo(C₁-C₄)alchil și -OR^c;

R^c este (C₁-C₄)alchil, halo(C₁-C₄)alchil sau (C₃-C₇)cicloalchil; și

R⁶ este halo (C₁-C₄)alchil.

De asemenea, sunt revendicate compozițiile farmaceutice care cuprind acești compuși precum și utilizarea compușilor în tratamentul cancerului așa cum este definit în revendicările anexate.

Inventatorii au descoperit faptul că acești și alți compuși descriși în conținut, precum și compozițiile acceptabile farmaceutic ale acestora, modulează activitatea EZH2 (a se vedea, de exemplu, **Tabelul 5**). Astfel de compuși îi includ pe cei cu Formula structurală **I**:



sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia, în care fiecare dintre R¹, R², R³, R⁴, R⁵, și X sunt definiți în conținut.

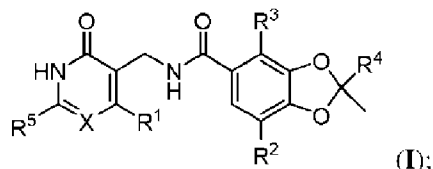
Într-un aspect, s-a găsit, de asemenea, că anumiți compuși descriși în conținut au timp de retenție crescut (de exemplu, > 100 de ore) și permeabilitate îmbunătățită. S-a descoperit faptul că o creștere a timpului de retenție (adică o rată mai lentă de oprire) și/sau permeabilitate se corelează cu activitatea celulară îmbunătățită.

Compușii dezvăluiți, sărurile acceptabile farmaceutic și compozițiile acceptabile farmaceutic sunt utili pentru tratarea unei varietăți de stări asociate cu enzimele modificatoare de metil. Aceste afecțiuni includ, de exemplu, unul sau mai multe tipuri de cancer.

DESCRIERE DETALIATĂ

1. Descrierea Generală a Compușilor

Sunt furnizați compuși cu Formula I:



sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia, în care:

R¹ este halogen, -S(C₁-C₄)alchil, -S(C₃-C₇)cicloalchil sau -S[halo(C₁-C₄)alchil];

X este CH sau N;

R² este hidrogen, halo, (C₁-C₄)alchil sau halo(C₁-C₄)alchil;

R³ este halogen, (C₁-C₄)alchil sau halo(C₁-C₄)alchil;

R⁴ este (C₃-C₇)cicloalchil sau heterocicil cu 4-7 membri, fiecare dintre acestea fiind opțional substituit cu 1 până la 3 grupări selectate dintre halo, (C₁-C₄)alchil, halo(C₁-C₄)alchil, (C₁-C₄)alcoxi, halo(C₁-C₄)alcoxi și -NR^aR^b;

R^a este hidrogen, alchil (C₁-C₄) sau halo (C₁-C₄)alchil;

R^b este (C₁-C₄)alchil, halo(C₁-C₄)alchil sau heterocicil cu 4-7 membri, în care respectiva grupare heterocicil este opțional substituită cu 1 până la 3 grupări selectate dintre halogen, (C₁-C₄)alchil, halo(C₁-C₄)alchil, (C₁-C₄)alcoxi și halo(C₁-C₄)alcoxi; sau

R^a și R^b împreună cu atomul de azot la care sunt atașați formează un ciclu heterocicil cu 4-7 membri opțional substituit cu 1 până la 3 grupări selectate dintre halogen, (C₁-C₄)alchil, halo(C₁-C₄)alchil și -OR^c;

R^c este (C₁-C₄)alchil, halo(C₁-C₄)alchil sau (C₃-C₇)cicloalchil; și

R⁵ este halogen, (C₁-C₄)alchil sau halo(C₁-C₄)alchil.

2. Definiții

Atunci când este utilizat în legătură cu descrierea unei grupări chimice care poate avea mai multe puncte de atașare, o cratimă (-) desemnează punctul de atașare al grupării respective la variabila la care este

definită. De exemplu, $-S(C_3-C_7)\text{cicloalchil}$ și $-S[\text{halo}(C_1-C_4)\text{alchil}]$ înseamnă faptul că locul de atașare pentru această grupare are loc pe atomul de sulf.

Termenii "halo" și "halogen" așa cum sunt utilizați în conținut se referă la un atom selectat dintre fluor (fluor, -F), clor (clor, -Cl), brom (brom, -Br) și iod (iod, -I).

Termenul "alchil", așa cum este utilizat în conținut, se referă la un radical hidrocarbură monovalent saturat, cu catenă liniară sau ramificată, având, dacă nu se specifică altfel, 1-10 atomi de carbon. Exemple de radicali alchil includ, dar nu sunt limitate la, metil, etil, n-propil, izopropil, n-butil, izo-butil, sec-butil, sec-pentil, izo-pentil, terț-butil, n-pentil, neopentil, n-hexil, sec-hexil și altele asemenea.

Termenul "haloalchil" include grupări mono, poli și perhaloalchil în care halogenii sunt selectați în mod independent dintre fluor, clor, brom și iod.

"Alcoxi" este o grupare alchil care este atașată la un alt fragment prin intermediul unui linker de oxigen ($-O(\text{alchil})$). Exemplele nelimitative includ metoxi, etoxi, propoxi și butoxi.

"Haloalcoxi" este o grupare haloalchil care este atașată la un alt fragment prin intermediul unui atom de oxigen, cum ar fi, de exemplu, dar nu se limitează la $-OCHCF_2$ sau $-OCF_3$.

Termenul "cicloalchil" se referă la un sistem ciclic hidrocarbonat monociclic, biciclic (de exemplu, un ciclu cu punte sau spirobiciclic) cu 3 până la 12 membri (de exemplu, 3 până la 7 membri) sau policiclic (de exemplu, triciclic), care este complet saturat. Grupările cicloalchil monociclice includ, fără limitare, ciclopropil, ciclobutil, ciclopentil, ciclohexil, cicloheptil și ciclooctil. Grupările cicloalchil biciclice cu punte includ, fără limitare, biciclo[3.2.1]octan, biciclo[2.2.1]heptan, biciclo[3.1.0]hexan, biciclo[1.1.1]pentan și altele asemenea. Grupările cicloalchil spirobiciclice includ, de exemplu, spiro[3.6]decan, spiro[4.5]decan și altele asemenea. Ciclurile cicloalchil condensate includ, de exemplu, decahidronaftalenă, octahidropentalenă și altele asemenea. Acolo unde este specificat faptul că sunt opțional substituiți sau substituiți, substituenții pe un ciclu cicloalchil (de exemplu, în cazul unui cicloalchil opțional substituit) pot fi prezenți în orice poziție substituibilă și, includ, de exemplu, poziția la care gruparea cicloalchil este atașată.

Termenul "heterociclic" semnifică faptul că un ciclu heterociclic saturat sau parțial nesaturat cu 3-12 membri (de exemplu, 4-, 5-, 6- și 7 membri) care conține 1 până la 4 heteroatomi selectați independent dintre N, O și S poate fi monociclic, biciclic (de exemplu, un ciclu biciclic cu punte, fuzionat sau spiro) sau triciclic. Termenii "heterociclu", "heterociclic", "ciclu heterociclic", "grupare heterociclică", "fragment heterociclic" și "radical heterociclic", sunt utilizați în mod interschimbabil în conținut. Un ciclu heterociclic poate fi atașat la grupul său pendent la orice heteroatom sau atom de carbon care are ca rezultat o structură stabilă. Exemple de astfel de radicali heterociclici saturați sau parțial nesaturați includ, fără limitare, tetrahidrofuranil, tetrahidrotienil, tetrahidropiranil, pirolidinil, piridinonil, pirolidonil, piperidinil, oxazolidinil, piperazinil, dioxanil, dioxolanil, dihidrofuranil, dihidropiranil, dihidropiridinil, tetrahidropiridinil, dihidropirimidinil, oxetanil, azetidinil și tetrahidropirimidinil. O grupare heterociclic poate fi mono- sau biciclică. Termenul "heterociclic" include de asemenea, de exemplu, radicali heterociclici nesaturați condensati la un alt radical heterociclic nesaturat sau inel arii sau heteroaril, cum ar fi, de exemplu, tetrahidronaftiridină, indolinonă, dihidropirolotriazol, imidazopirimidină, chinolinonă, dioxaspirodecan. Acolo unde se specifică ca fiind substituiți sau substituiți opțional, substituenții pe un heterociclic (de exemplu, în cazul unui heterociclic opțional substituit) pot fi prezenți în orice poziție substituibilă și, includ, *e.g.*, poziția la care este atașată gruparea heterociclic.

Termenul "spiro" se referă la două cicluri care au în comun un atom din ciclu (de exemplu, carbon).

Termenul "condensat" se referă la două cicluri care împart doi atomi adiacenți unul cu celălalt.

Termenul "punte" se referă la două inele care au în comun trei sau mai mulți atomi de inel unul cu celălalt.

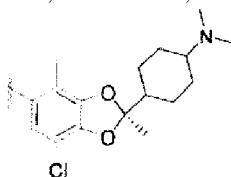
Așa cum este utilizat în conținut, "izomer geometric" se referă la izomeri care diferă în orientarea atomilor substituenți în relație cu un ciclu cicloalchil, adică izomeri cis sau trans. Când un compus dezvoltat este denumit sau descris după structură fără a indica o anumită formă de izomer geometric cis sau trans, trebuie înțeles că denumirea sau structura cuprinde un izomer geometric fără alți izomeri geometrici, amestecuri de izomeri geometrici sau amestecuri îmbogățite într-un izomer geometric în raport cu izomerul său geometric corespunzător.

Dacă nu se specifică altfel, atunci când stereochimia unui compus dezvoltat este denumită sau descrisă prin structură, stereoizomerul denumit sau reprezentat este cel puțin 60%, 70%, 80%, 90%, 99% sau 99,9% în greutate optic pur față de toate ceilalți stereoizomeri. Când un singur enantiomer este denumit sau descris după structură, enantiomerul descris sau denumit este cel puțin 60%, 70%, 80%, 90%, 99% sau 99,9% în greutate optic pur. Puritya optică procentuală în greutate este raportul dintre greutatea enantiomerului și greutatea enantiomerului plus greutatea izomerului său optic. Enantiomerii pot fi separați prin metode cunoscute specialiștilor în domeniu, de exemplu prin formarea de săruri diastereoizomerice care pot fi separate, de exemplu, prin cristalizare; formarea derivaților sau complexelor diastereoizomerice

care pot fi separați, de exemplu, prin cristalizare, cromatografie în fluid sau lichid supercritic; reacția selectivă a unui enantiomer cu un reactiv specific enantiomerului, de exemplu esterificarea enzimatică; sau cromatografie în fluid sau lichid supercritic într-un mediu chiral, de exemplu pe un suport chiral de exemplu silice cu un ligand chiral legat sau în prezența unui solvent chiral. Enantiomerii specifici pot fi, de asemenea, sintetizați prin sinteză asimetrică utilizând reactivi, substraturi, catalizatori sau solvenți optic activi, sau prin conversia unui enantiomer în altul prin transformare asimetrică.

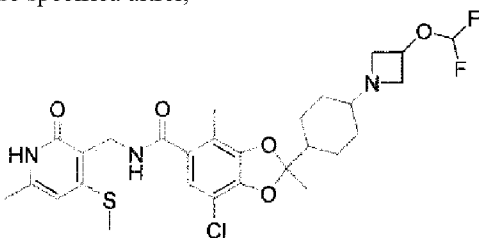
Dacă nu se specifică altfel, atunci când un compus dezvăluit este denumit sau descris după structură fără a indica stereochemia și compusul are cel puțin un centru chiral sau cel puțin un izomer geometric sau ambele, numele sau structura cuprinde un enantiomer sau izomer geometric al compus fără izomerul optic sau izomerul geometric corespunzător, un amestec racemic de compus și amestecuri îmbogățite într-un enantiomer sau izomer geometric în raport cu izomerul optic sau izomerul geometric corespunzător.

Dacă nu se specifică altfel, atunci când doar unii dintre centrii stereochemici dintr-un compus dezvăluit sunt reprezentați sau denumiți după structură, configurația denumită sau reprezentată este îmbogățită în raport cu configurațiile rămase, de exemplu, cu un exces molar de cel puțin 60%, 70%, 80%, 90%, 99% sau 99,9%. De exemplu, substructura:



înseamnă faptul că configurația despre carbonul chiral este îmbogățită stereochemic ca R (de exemplu, printr-un exces molar de cel puțin 60%, 70%, 80%, 90%, 99% sau 99,9%) și că geometria despre ciclohexil poate fi cis sau trans sau un amestec al acestora.

În anumite cazuri, un compus dezvăluit este descris prin structură fără a indica stereochemia, dar este identificat ca fiind îmbogățit stereochemic (de exemplu, "un singur enantiomer; izomer geometric unic" sau "un singur enantiomer" în cazurile în care izomerii geometrici nu sunt posibili). De exemplu, dacă nu se specifică altfel,



Exemplul 1 (un singur enantiomer; izomer geometric unic), înseamnă faptul că configurația despre atomul de carbon dioxolanil chiral este îmbogățită stereochemic ca R (de exemplu, printr-un exces molar de cel puțin 60%, 70%, 80%, 90%, 99% sau 99,9%) sau este îmbogățit stereochemic ca S (de exemplu, printr-un exces molar de cel puțin 60%, 70%, 80%, 90%, 99% sau 99,9%) și că configurația geometrică despre ciclul ciclohexil este îmbogățită sub forma cis (de ex., printr-un exces molar de cel puțin 60%, 70%, 80%, 90%, 99% sau 99,9%) sau este îmbogățit sub forma trans (de exemplu, cu un exces molar de cel puțin 60%, 70%, 80%, 90%, 99% sau 99,9%).

Termenul "pacient", așa cum este utilizat în conținut, înseamnă un animal, cum ar fi un mamifer, și cum ar fi un om. Termenii "subiect" și "pacient" pot fi folosiți interschimbabil.

Termenul "purător acceptabil farmaceutic" se referă la un purător, adjuvant sau vehicul netoxic care nu distruge activitatea farmacologică a compusului cu care este formulat. Purătorii, adjuvanții sau vehiculele acceptabile farmaceutice care pot fi utilizați în compozițiile descrise în conținut includ, dar nu se limitează la, schimbători de ioni, alumină, stearat de aluminiu, lecitină, proteine serice, cum ar fi albumina serică umană, substanțe tampon cum ar fi fosfații, glicina, acid sorbic, sorbat de potasiu, amestecuri parțiale de gliceride de acizi grași vegetali saturați, apă, săruri sau electroliți, cum ar fi sulfat de protamină, fosfat acid disodic, fosfat acid de potasiu, clorură de sodiu, săruri de zinc, silice coloidal, trisilicat de magneziu, polivinil pirolidonă, substanțe pe bază de celuloză, polietilen glicol, carboximetilceluloză de sodiu, poliacrilați, ceară, polimeri bloc de polietilen-polioxiopropilenă, polietilen glicol și grăsime de lână.

Termenii "tratament", "tratare" și "a trata" se referă la inversarea, atenuarea sau inhibarea progresului unei boli sau tulburări sau la unul sau mai multe simptome ale acesteia, așa cum este descris în conținut. De asemenea, tratamentul poate fi continuat după ce simptomele s-au rezolvat, de exemplu pentru a întârzia recurența.

Boala, tulburarea și starea sunt folosite în conținut în mod interschimbabil.

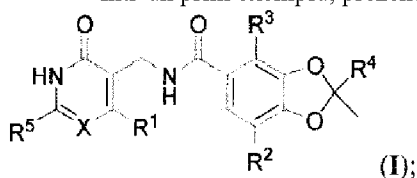
Termenul "cantitate eficientă" sau "cantitate eficientă terapeutică" se referă la o cantitate dintr-un compus descris în conținut care va provoca un răspuns biologic sau medical al unui subiect, de exemplu, o doză cuprinsă între 0,01 - 100 mg/kg greutate corporală/zi. termenii "subiect" și "pacient" pot fi folosiți interschimbabil și înseamnă un mamifer care are nevoie de tratament, *de ex.*, animale de companie (*de ex.*, câini, pisici și altele asemenea), animale fermă (*de ex.*, vaci, porci, cai, oi, capre și altele asemenea) și animale de laborator (*de ex.*, șobolani, șoareci, cobai și altele asemenea). De obicei, subiectul este un om care are nevoie de tratament.

Termenul "inhibare", "a inhiba" sau "inhibiție" include o scădere a activității de bază a unei activități sau proces biologic.

Compușii descriși în conținut pot fi prezenți sub formă de săruri acceptabile farmaceutic. Pentru utilizare în medicamente, sărurile compușilor descriși în conținut se referă la "săruri acceptabile farmaceutic" netoxice. Formele de sare acceptabile farmaceutic includ săruri acide/anionice sau bazice/cationice acceptabile farmaceutic. Sărurile de aditie acidă adecvate acceptabile farmaceutic ale compușilor descriși în conținut includ, de exemplu, sărurile acizilor anorganici (cum ar fi acidul clorhidric, acid bromhidric, fosforic, azotic și sulfuric) și ale acizilor organici (cum ar fi acidul acetic, benzensulfonic, benzoic, metansulfonic). și acizi p-toluensulfonici).

3. Descrierea Compușilor Exemplari

Într-un prim exemplu, prezenta dezvăluire furnizează un compus cu Formula I:



sau o sare acceptabilă farmaceutică a acestuia, în care variabilele sunt ca mai sus pentru Formula I.

Într-un al doilea exemplu, în compușii cu Formula I,

R¹ este halogen sau -(C₁-C₄)alchil;

R² este halogen;

R³ este (C₁-C₄)alchil;

R⁴ este (C₃-C₇)cicloalchil sau (C₄-C₇)heterociclil, fiecare dintre acestea fiind opțional substituit cu 1 până la 2 grupări selectate dintre halo(C₁-C₄)alchil și -NR^aR^b;

R^a este hidrogen sau (C₁-C₄)alchil;

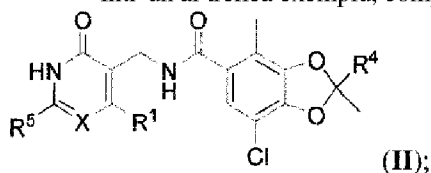
R^b este (C₁-C₄)alchil sau (C₄-C₇)heterociclil, în care respectiva grupare heterociclil este opțional substituită cu halo(C₁-C₄)alchil; sau

R^a și R^b împreună cu atomul de azot la care sunt atașați formează un ciclu heterociclil cu 4-7 membri care conține azot opțional substituit cu 1 până la 3 grupări selectate dintre halogen și -OR^c;

R^c este (C₁-C₄)alchil, halo(C₁-C₄)alchil sau (C₃-C₇)cicloalchil; și

R⁵ este halogen sau (C₁-C₄)alchil.

Într-un al treilea exemplu, compusul cu Formula I este de Formula II:



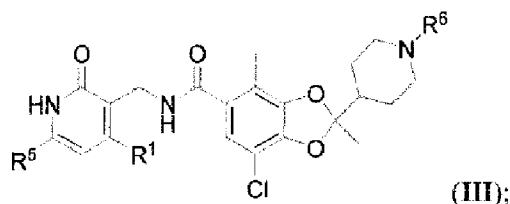
sau o sare acceptabilă farmaceutică a acestuia, în care variabilele rămase sunt cele descrise mai sus pentru Formula I sau al doilea exemplu.

Într-un al patrulea exemplu, R¹ în compusul cu Formula I sau Formula II este clor, în care variabilele rămase sunt cele descrise mai sus pentru Formula I sau al doilea exemplu.

Într-un al cincilea exemplu, R¹ în compusul cu Formula I sau Formula II este -SCH₃, în care variabilele rămase sunt cele descrise mai sus pentru Formula I sau al doilea exemplu.

Într-un al șaselea exemplu, R⁴ în compusul cu Formula I sau Formula II este ciclohexil sau piperidinil, fiecare dintre acestea fiind opțional substituit cu 1 până la 2 grupări selectate dintre halo(C₁-C₄)alchil și -NR^aR^b, în care variabilele rămase sunt cele descrise mai sus pentru Formula I sau al doilea, al patrulea sau al cincilea exemplu.

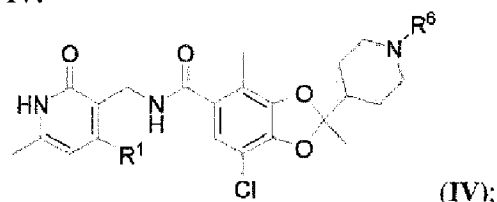
Într-un al șaptelea exemplu, compusul cu Formula I sau Formula II este descris de Formula III:



sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia, în care R^6 este halo (C_1 - C_4)alchil, și în care variabilele rămase sunt cele descrise mai sus pentru Formula I sau al doilea, al patrulea sau al cincilea exemplu.

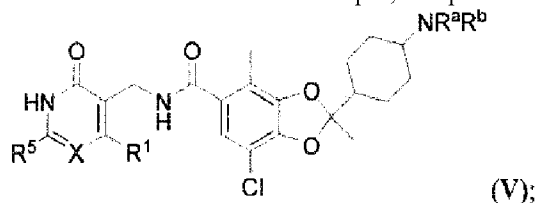
Într-un al optulea exemplu, compusul cu Formula I, Formula II, sau Formula III este de Formula

5 IV:



sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia, în care variabilele rămase sunt cele descrise mai sus pentru Formula I sau al doilea, al patrulea, al cincilea sau al șaptelea exemplu.

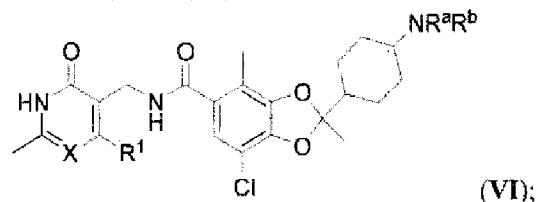
Într-un al nouălea exemplu, compusul cu Formula I sau Formula II este de Formula V:



10

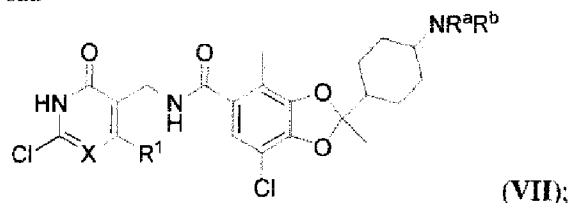
sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia, în care variabilele rămase sunt cele descrise mai sus pentru Formula I sau al doilea, al patrulea sau al cincilea exemplu.

Într-un al zecelea exemplu, compusul cu Formula I, Formula II, sau Formula V este descris de Formula VI sau VII:



15

sau



sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia, în care variabilele și caracteristicile rămase sunt cele descrise mai sus pentru Formula I sau al doilea, al patrulea sau al cincilea exemplu.

20

Într-un al unsprezecelea exemplu, R^b în compuşii cu Formula I, Formula II, Formula V, Formula VI, și Formula VII este (C_1 - C_4)alchil sau oxatanil, în care respectiva grupare oxetanil menționat este opțional substituită cu halo(C_1 - C_4)alchil; sau R^a și R^b împreună cu atomul de azot de care sunt atașați formează o grupare azetidinil opțional substituită cu halo sau $-OR^c$, în care variabilele și caracteristicile rămase sunt cele descrise mai sus pentru Formula I sau al doilea, al patrulea sau al cincilea exemplu.

25

Într-un al doisprezecelea exemplu, R^a în compuşii cu Formula I, Formula II, Formula V, Formula VI, și Formula VII este hidrogen sau metil; și R^b este gruparea metil sau oxatanil, în care respectiva grupare oxetanil este opțional substituită cu $-CH_2F$ sau $-CF_3$, în care variabilele și caracteristicile rămase sunt cele descrise mai sus pentru Formula I sau al doilea, al patrulea, al cincilea sau al unsprezecelea exemplu.

30

Într-un al treisprezecelea exemplu, R^a și R^b în compuşii cu Formula I, Formula II, Formula V, Formula VI, și Formula VII împreună cu atomul de azot de care sunt atașați formează o grupare azetidinil opțional substituită cu 1 până la 2 atomi de fluor sau $-OR^c$; și R^c este $-CH_3$, $-CHF_2$, sau ciclopropil, în care

variabilele și caracteristicile rămase sunt cele descrise mai sus pentru Formula **I** sau al doilea, al patrulea, al cincilea sau al unsprezecelea exemplu.

Într-un al paisprezecelea exemplu, configurația grupării 1,3-dioxolanil și a NR^aR^b în oricare dintre Formulele **I**, **II**, **V**, **VI**, și **VII** sunt orientate în poziția trans în jurul grupării ciclohexil, în care caracteristicile rămase sunt cele descrise mai sus pentru Formula **I** sau al doilea, al patrulea, al cincilea, al șaselea, al unsprezecelea, al doisprezecelea sau al treisprezecelea exemplu. Alternativ, configurația grupării 1,3-dioxolanil și a grupării NR^aR^b din Formulele **I**, **II**, **V**, **VI**, și **VII**, sunt orientate în poziția cis în jurul grupării ciclohexil, în care caracteristicile rămase sunt cele descrise mai sus pentru Formula **I** sau al doilea, al patrulea, al cincilea, al șaselea, al unsprezecelea, al doisprezecelea sau al treisprezecelea exemplu.

Într-un al cincisprezecelea exemplu, configurația stereochemică a centrului chiral al grupării 1,3-dioxolanil în oricare dintre Formulele **I**, **II**, **III**, **IV**, **V**, **VI**, și **VII** este R, în care caracteristicile rămase sunt cele descrise mai sus pentru Formula **I** sau al doilea, al patrulea, al cincilea, al șaselea, al unsprezecelea, al doisprezecelea, al treisprezecelea sau al paisprezecelea exemplu. Alternativ, configurația stereochemică a centrului chiral al grupării 1,3-dioxolanil în oricare dintre Formulele **I**, **II**, **III**, **IV**, **V**, **VI**, și **VII** este S, în care caracteristicile rămase sunt cele descrise mai sus pentru Formula **I** sau al doilea, al patrulea, al cincilea, al șaselea, al unsprezecelea, al doisprezecelea, al treisprezecelea sau al paisprezecelea exemplu.

Exemple specifice de compuși sunt furnizate în secțiunea EXEMPLIFICARE și sunt incluse ca parte a unui al paisprezecelea exemplu din conținut. Sunt incluse, de asemenea, sărurile acceptabile farmaceutice, precum și formele neutre ale acestor compuși. Într-un aspect, prezenta dezvoltare include forme racemice ale oricărui compus descris în conținut.

4. Utilizări, Formulare și Administrare

În unele variante de realizare, prezenta dezvoltare furnizează o compoziție care cuprinde un compus descris în conținut sau un derivat acceptabil farmaceutic al acestuia și un purtător acceptabil farmaceutic. Cantitatea de compus dintr-o compoziție furnizată este astfel încât este eficientă pentru a modula în mod măsurabil o enzimă de modificare a metil histonelor sau un mutant al acesteia, într-o probă biologică sau la un pacient.

În anumite variante de realizare, o compoziție descrisă în conținut este formulată pentru administrare la un pacient care are nevoie de o astfel de compoziție. Compozițiile descrise în conținut pot fi administrate pe cale orală, parenterală, prin pulverizare prin inhalare, topic, rectal, nazal, bucal, vaginal sau printr-un rezervor implantat. Termenul "parenteral" așa cum este utilizat în conținut include tehnici de injectare sau perfuzie subcutanată, intravenoasă, intramusculară, intra-articulară, intra-sinovială, intrasternală, intratecală, intrahepatică, intralezională și intracraniană. În unele variante de realizare, compozițiile sunt administrate oral, intraperitoneal sau intravenos. Formele injectabile sterile ale compozițiilor descrise în conținut pot fi suspensii apoase sau oleaginoase. Aceste suspensii pot fi formulate conform tehnicilor cunoscute în domeniu utilizând agenți de dispersie sau umectare și agenți de suspendare adecvați.

În unele variante de realizare, compozițiile sunt administrate oral.

O doză specifică și un regim de tratament pentru orice pacient anume va depinde de o varietate de factori, inclusiv de activitatea compusului specific utilizat, vârsta, greutatea corporală, starea generală de sănătate, sexul, dieta, timpul de administrare, rata de excreție, combinația de medicamente, și judecata medicului curant și severitatea bolii particulare care este tratată. Cantitatea de compus descrisă în conținut în compoziție va depinde de asemenea de compusul particular din compoziție.

Compuși și compozițiile descrise în conținut sunt în general utili pentru modularea activității uneia sau mai multor enzime implicate în reglarea epigenetică și în special EZH1 și EZH2 și, chiar mai specific EZH2 și formele mutante ale acestora. În unele variante de realizare, compuși descriși în conținut reduc sau suprimă activitatea EZH2. În unele realizări, compuși descriși în conținut sunt antagoniști ai activității EZH2. În unele variante de realizare, compuși descriși în conținut reduc sau suprimă activitatea EZH1. În unele realizări, compuși descriși în conținut sunt antagoniști ai activității EZH1.

În unele variante de realizare, compuși și compozițiile descrise în conținut sunt utili în tratarea bolilor și/sau tulburărilor asociate cu supraexpresia EZH1 sau EZH2 și/sau expresia unei forme mutante a EZH2, cum ar fi acele forme mutante care modifică activitatea substratului EZH2. Studiul delețiilor EZH2, al mutațiilor de tip aberant și schimbare de cadru - frameshift sugerează faptul că EZH2 funcționează ca supresor tumoral în tulburările sanguine, cum ar fi sindroamele mielodisplazice (MDS) și afecțiunile maligne mieloidale (Ernst și colab., Nat Genet. august 2010; 42(8):722-6; Nikoloski și colab., Nat Genet. august 2010; 42(8):665-7). În unele realizări, compuși și compozițiile descrise în conținut sunt utili în tratarea bolilor și/sau a tulburărilor asociate cu prezența EZH2 având o mutație Y641N, Y641C, Y641F, Y641H, Y641S, A677G sau A687. Într-un aspect particular al acestei realizări, EZH2 are o mutație Y641N.

În unele variante de realizare, prezenta dezvăluire furnizează un compus, sau o sare acceptabilă farmaceutic sau o compoziție a acestuia, pentru utilizare în tratamentul unui subiect care suferă de o boală și/sau tulburare asociată cu supraexprimarea EZH1 sau EZH2 și/sau exprimarea unei forme mutante a EZH2. În unele variante de realizare, utilizarea de mai sus cuprinde suplimentar etapa preliminară de a determina dacă subiectul supraexprimă EZH2 sau exprimă o formă mutantă a EZH2. Utilizările descrise ale compuşilor în metodele de tratament terapeutic al corpului uman sau animal în următoarele paragrafe nu fac obiectul revendicărilor și trebuie interpretate ca însemnând compusul(i) pentru utilizare într-o astfel de metodă/utilizare terapeutică. Sfera de întindere este definită în revendicările anexate.

În unele variante de realizare, boala sau tulburarea asociată cu prezența unei forme mutant a EZH2 este un limfom cu celule B umane. În unele variante de realizare, boala și/sau tulburarea asociată cu prezența Y641N EZH2 este limfom folicular sau limfom difuz cu celule B mari. În unele variante de realizare, compușii sau compozițiile descrise în conținut sunt utili în tratarea tulburărilor sanguine, cum ar fi sindroamele mielodisplazice, leucemia, anemia și citopenia. Sneeringer și colab., "Coordinated activities of wild-type plus mutant EZH2 drive tumor-associated hypertrimethylation of lysine 27 on histone H3 (H3K27) in human B-cell lymphomas", Sneeringer și colab., Proc. Natl Acad. Sci. 2010 Dec; 109(48):20980-20985.

În unele variante de realizare, compușii și compozițiile descrise în conținut sunt utili în tratarea bolilor și/sau tulburărilor asociate cu proliferarea celulară. În unele variante de realizare, compușii și compozițiile descrise în conținut sunt utili în tratarea bolilor și/sau tulburărilor asociate cu reglarea aberantă a ciclului celular sau reglare ADN-ului. În unele variante de realizare, compușii și compozițiile descrise în conținut sunt utili în tratarea cancerului.

Într-un aspect, cancerele care pot fi tratate prin compușii, compozițiile și metodele descrise în conținut includ, dar nu sunt limitate la: cancer Cardiac: sarcom (angiosarcom, fibrosarcom, rabdomiosarcom, liposarcom), mixom, rabdioniom, fibrom, lipom și teratom; Plămân: carcinom bronhogen (celule scuamoase, celule mici nediferențiate, celule mari nediferențiate, adenocarcinom), carcinom alveolar (bronșiolar), adenom bronșic, sarcom, limfom, hamartom condromatos, mezoteliom; Gastrointestinale: esofag (carcinom cu celule scuamoase, adenocarcinom, leiomiosarcom, limfom), stomac (carcinom, limfom, leiomiosarcom), pancreas (adenocarcinom ductal, insulinom, glucagonom, gastrinom, tumori carcinoide, vipoame, carcinom cu celule mici, limfom, tumori carcinoide), sarcom Kaposi, leiomiom, hemangiom, lipom, neurofibrom, fibrom), intestin gros (adenocarcinom, adenom tubular, adenom vilos, hamartom, leiomiom); Tract genito-urinar: rinichi (adenocarcinom, tumora Wilm (nefroblastom), limfom, leucemie), vezică urinară și uretră (carcinom cu celule scuamoase, carcinom cu celule tranzitionale, adenocarcinom), prostata (adenocarcinom, sarcom), testicul (seminom, teratom, carcinom embrionar, teratom, coriocarcinom, sarcom, carcinom cu celule interstițiale, fibrom, fibroadenom, tumori adenomatoide, lipom); Ficat: hepatom (carcinom hepatocelular), colangiocarcinom, hepatoblastom, angiosarcom, adenom hepatocelular, hemangiom; Os: sarcom osteogenic (osteosarcom), fibrosarcom, histiocitom fibros malign, condrosarcom, sarcom Ewing, limfom malign (sarcom cu celule reticulate), mielom multiplu, cordon tumoral malign cu celule gigantice, osteocrom (osteocartilaginos), condromioid benigno condromatos, condrom benign osteom și tumori cu celule gigantice; Sistem nervos: craniu (osteom, hemangiom, granulom, xantom, osteită deformantă), meninge (meningioid, meningiosarcom, gliomatoză), creier (astrocitom, meduloblastom, gliom, ependimom, germinom (pinealom), glioblastom multiform, oligodendrogliom multiform, oligodendrogliom, gliomatom tumori congenitale), neurofibrom al măduvei spinării, meningioid, gliom, sarcom); Ginecologic: uter (carcinom endometrial), col uterin (carcinom cervical, displazie cervicală pretumorală), ovare (carcinom ovarian (cistadenocarcinom seros, chistadenocarcinom mucinos, carcinom cu celule clare, carcinom neclasificat), tumori cu celule granulo-tecale, celule tumorale Sertoli-Leydig, disgerminom, teratom malign), vulva (carcinom cu celule scuamoase, carcinom intraepitelial, adenocarcinom, fibrosarcom, melanom), vagin (carcinom cu celule clare, carcinom cu celule scuamoase, sarcom botryoid (rabdomiosarcom embrionar), trompe (carcinom); Hematologic: (leucemie mieloidă (acută și cronică), leucemie limfoblastică acută, leucemie limfocitară cronică, boli mieloproliferative, mielom multiplu, sindrom mielodisplazic), boala Hodgkin, limfom non-Hodgkin malign Cutanat: melanom malign, carcinom cu celule bazale); Sarcom Kaposi, alunițe nevi displazici, lipom, angioid, dermatofibrom, cheloizi, psoriazis și cancer de Glande suprarenale: neuroblastom;

Într-un aspect, cancerul tratat prin compușii, compozițiile și metodele descrise în conținut este selectat dintre cancer suprarenal, carcinom cu celule acinice, neurom acustic, melanom lentiginos acral, acrospirom, leucemie acută eozinofilă, leucemie acută eritroidă, leucemie limfoblastică acută, leucemie acută megacarioblastică, leucemie, leucemie acută monocitară, leucemie acută promielocitară, adenocarcinom, carcinom chistic adenoid, adenom, tumoră odontogenă adenomatoidă, carcinom adenoscuos, neoplasm de țesut adipos, carcinom suprarenocortical, leucemie/limfom cu celule T la adulți,

leucemie cu celule NK-agresivă, limfom asociat AIDS, rabdomiosarcom alveolar, sarcom alveolar al părții moi, fibrom ameloblastic, limfom anaplastic cu celule mari, cancer tiroidian anaplastic, limfom angioimunoblastic cu celule T, angiomiolipom, angiosarcom, astrocitom, tumoare rabdoidă teratoidă atipică, leucemie limfocitică cronică cu celule B, leucemie prolimfocitică cu celule B, limfom cu celule B, carcinom bazocelular, cancer de tract biliar, cancer de vezică urinară, blastom, cancer osos, tumora Brenner, tumora Brown, limfom Burkitt, cancer mamar, cancer cerebral, carcinom, carcinom in situ, carcinosarcom, tumora cartilajului, cementom, sarcom mieloid, condrom, cordon, coriocarcinom, papilom plex coroid, sarcom renal cu celule clare, craniofaringiom, limfom cutanat cu celule T, cancer de col uterin, cancer colorectal, boala Degos, tumoare desmoplazică cu celule mici rotunde, limfom difuz cu celule B mari, tumora neuroepitelială disembrioplazică, disgerminom, carcinom embrionar, neoplasm al glandei endocrine, tumora sinusală endodermică, limfom cu celule T asociat enteropatiei, cancer esofagian, fetus la făt, fibrom, fibrosarcom, limfom folicular, cancer folicular tiroidian, ganglioneurom, cancer gastrointestinal, cancer cu celule germinale coriocarcinom gestațional, fibroblastom cu celule gigantice, tumora cu celule gigantice a osului, tumora glială, glioblastom multiform, gliom, gliomatoză cerebrală, glucagonom, gonadoblastom, tumora cu celule granuloase, ginandroblastom, cancer de vezică biliară, cancer gastric, leucemie cu celule păroase, hemangioblastom, cancer de cap și gât, hemangiopericitom, malignitate hematologică, hepatoblastom, limfom hepatosplenic cu celule T, limfom Hodgkin, limfom non-Hodgkin, carcinom lobular invaziv, cancer intestinal, cancer de rinichi, cancer laringian, lentigo maligna, carcinom cu linie mediană letală, tumoare cu celule leydig, liposarcom, cancer pulmonar, limfangiom, limfangiosarcom, limfoepiteliom, limfom, leucemie limfocitară acută, leucemie mielogenă acută, leucemie limfocitară cronică, cancer hepatic, cancer pulmonar cu celule mici, cancer pulmonar cu celule non-mici, limfom MAL T, histiocitom malign fibros, tumora, tumora celule de manta a nervilor periferici, limfom cu celule B din zona marginală, leucemie mastocitară, tumora cu celule germinale mediastinale, carcinom medular al sânului, cancer medular tiroidian, meduloblastom, melanom, meningiom, cancer cu celule Merkel, mezoteliom, carcinom urotelial metastatic, tumora mixtă Mulleriană, tumora mucinoasă, mielom multiplu, neoplasm al țesutului muscular, liposarcom mixoid, mixom, mixosarcom, carcinom nazofaringian, neurinom, neuroblastom, neurofibrom, neurom, melanom nodular, cancer ocular, oligoastrocitom, oligodendrogliom, oncocitom, meningiom de teaca nervoasă optică, tumora nervului optic, cancer oral, osteosarcom, cancer ovarian, tumora Pancoast, cancer tiroidian papilar, paragangliom, pinealoblastom, pineocitom, pituiticim, adenom hipofizar, tumora hipofizara, plasmacitom, poliembriom, limfom sistem nervos central primar, limfom primar de efuziune, cancer peritoneal primar, cancer de prostată, cancer pancreatic, cancer faringian, pseudomixom peritonei, carcinom cu celule renale, carcinom medular renal, retinoblastom, rabdomiom, rabdomiosarcom, transformare Richter, cancer rectal, Schwannomatoză, tumoare celule Sertoli, tumora stromală a cordonului sexual-gonadal, carcinom cu celule cu inel, cancer de piele, tumori celule cu mici rotunde albastre, carcinom cu celule mici, sarcom de țesut moale, somatostatonom, negi, tumora spinală, limfom splenic din zona marginală, carcinom cu celule scuamoase, sarcom sinovial, boala Sezary, cancer de intestin subțire, carcinom scuamos, cancer de stomac, limfom cu celule T, cancer testicular, tecom, cancer tiroidian, carcinom cu celule tranziționale, cancer de gât, cancer urachal, cancer urogenital, carcinom urotelial, melanom uveal, cancer uterin, carcinom verrucos, gliom al căii vizuale, cancer vulvar, cancer vaginal, macroglobulinemie Waldenstrom, tumora Warthin și tumora Wilms.

Într-un aspect, cancerul tratat prin compuşii, compozițiile și metodele descrise în conținut este selectat dintre adenocarcinom, leucemie/limfom cu celule T pentru adulți, cancer de vezică urinară, blastom, cancer osos, cancer de sân, cancer de creier, carcinom, sarcom mieloid, cancer cervical, cancer colorectal, cancer esofagian, cancer gastrointestinal, glioblastom multiform, gliom, cancer vezicii biliare, cancer gastric, cancer la cap și gât, limfom Hodgkin, limfom non-Hodgkin, cancer intestinal, cancer renal, cancer laringian, leucemie, cancer pulmonar, limfom, cancer hepatic, cancer pulmonar cu celule mici, cancer pulmonar cu celule non-mici, mezoteliom, mielom multiplu, leucemie mieloidă acută (AML), limfom difuz cu celule B mari (DLBCL), cancer ocular, tumora a nervului optic, cancer oral, cancer ovarian, tumora pituitară, limfom primar al sistemului nervos central, cancer de prostată, cancer pancreatic, cancer faringian, carcinom cu celule renale, cancer rectal, sarcom, cancer de piele, tumora spinală, cancer de intestin subțire, cancer de stomac, limfom cu celule T, cancer testicular, cancer de tiroidă, cancer de gât, cancer urogenital, carcinom urotelial, cancer uterin, cancer vaginal și tumora Wilms.

Într-un aspect, cancerul tratat de compuşii, compozițiile și utilizările descrise în conținut sunt selectate dintre cancerul de sân, cancerul de prostată, cancerul de colon, carcinomul cu celule renale, cancer glioblastom multiform, cancerul vezicii urinare, melanomul, cancerul bronșic, limfom și cancer hepatic.

De asemenea, este furnizată utilizarea unui compus descris în conținut, sau a unei sări acceptabile farmaceutic a acestuia, sau a unei compoziții care cuprinde un compus dezvăluit sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia, pentru fabricarea unui medicament pentru tratarea unei afecțiuni descrise în

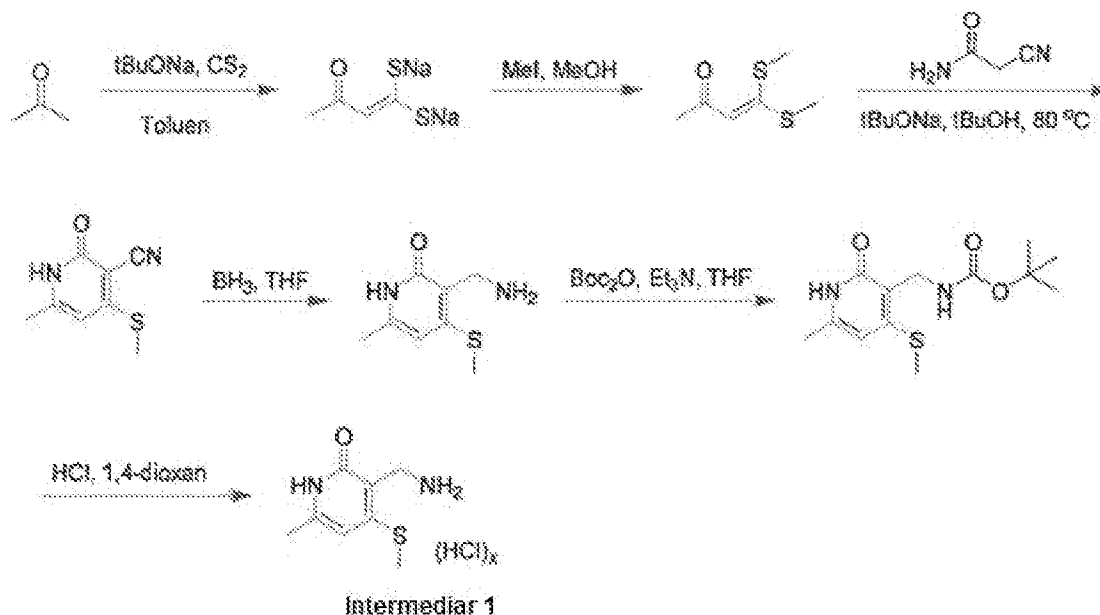
conținut. De asemenea, este furnizat un compus descris în conținut, sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia, sau o compoziție care cuprinde un compus dezvăluit sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia, pentru utilizare în tratarea unei stări descrise în conținut.

5 EXEMPLIFICARE

Exemplele reprezentative care urmează sunt destinate să ajute la ilustrarea invenției.

PREPARARE INTERMEDIARI

Intermediar 1: 3-(aminometil)-6-metil-4-(metiltio)piridin-2(1H)-onă (sare clorhidrat)



Etapă 1: Sinteza 3-oxobut-1-en-1,1-bis(tiolat) de sodiu

Un amestec de terț-butoxid de sodiu (16,6 g, 172 mmoli) în toluen (30 ml) a fost degazat sub vid și purgat cu azot (3 cicluri). S-a adăugat apoi acetona (5,0 g, 6,4 mL, 86 mmol) la 0°C urmată de adăugarea lentă de disulfură de carbon (6,6 g, 5,24 mL, 86 mmol). Amestecul rezultat a fost agitat la 0°C timp de 4 ore, apoi filtrat. Turta de filtrare a fost uscată sub vid pentru a da compusul din titlu (15,4 g, brut) ca un solid galben, care a fost utilizat în etapa următoare fără purificare suplimentară.

Etapă 2: Sinteza 4,4-bis(metiltio)but-3-en-2-onă

La o soluție de 3-oxobut-1-en-1,1-bis(tiolat) de sodiu (15,4 g, 86,4 mmol) în metanol (90 mL) s-a adăugat lent iodmetan (24,5 g, 10,7 mL, 173 mmol). Amestecul a fost agitat la 70°C timp de 1 oră, apoi concentrat la sec. S-a adăugat apă (30 mL) și produsul dorit a fost extras cu acetat de etil (60 mL x 3). Straturile organice combinate au fost uscate pe sulfat de sodiu și concentrate sub presiune redusă pentru a da compusul din titlu (6,8 g, randament 42%) sub formă de ulei maron, care a fost utilizat în etapa următoare fără purificare suplimentară. LCMS $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z: calculat 163,0; găsit 163,0. ^1H RMN (400 MHz, Cloroform- d) δ 6,02 (s, 1 H), 2,45 (s, 3H), 2,43 (s, 3H), 2,15 (s, 3H).

Etapă 3: Sinteza 6-metil-4-(metiltio)-2-oxo-1,2-dihidropiridin-3-carbonitril

La o soluție de 4,4-bis(metiltio)but-3-en-2-onă (2,9 g, 18 mmoli) și 2-cianoacetamidă (1,5 g, 18 mmoli) în terț-butanol (50 ml) s-a adăugat terț-butoxid de sodiu (1,9 g, 20 mmol). Amestecul a fost agitat la 80°C timp de 12 ore (două loturi de reacție au fost efectuate și combinate în această etapă). S-a adăugat apă (20 ml) și pH-ul a fost ajustat la 5-6 cu acid clorhidric 10%. Amestecul rezultat a fost filtrat, iar turta de filtrare a fost spălată cu eter de petrol (20 ml x 2), apoi turta a fost uscată sub vid pentru a da compusul din titlu (4,8 g, randament 74%) sub formă de solid alb mat, care a fost utilizat în etapa următoare fără purificare suplimentară. LCMS $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z: calculat 181,0; găsit 181,0. ^1H RMN (400 MHz, Dimetilsulfoxid- d_6) δ 6,27 (s, 1 H), 2,56 (s, 3H), 2,25 (s, 3H).

Etapă 4: Sinteza 3-(aminometil)-6-metil-4-(metiltio)piridin-2(1H)-onă

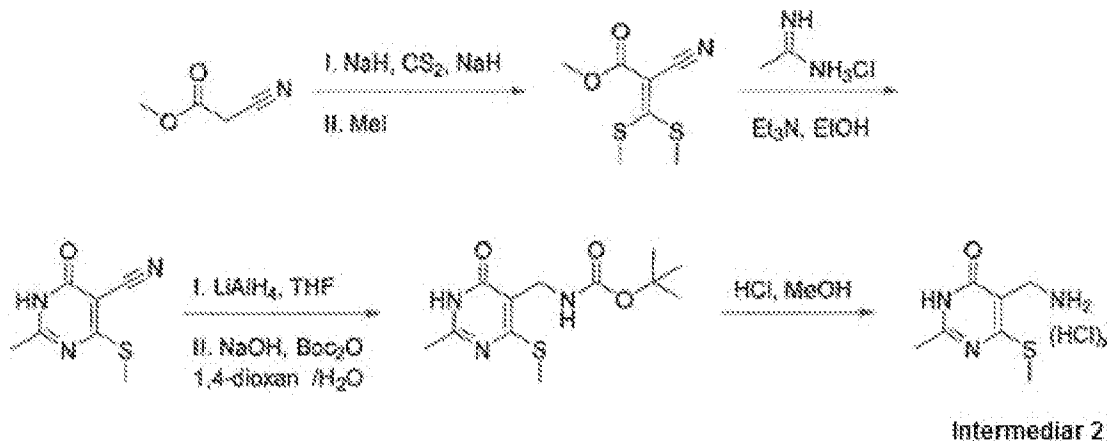
Un amestec de 6-metil-4-(metiltio)-2-oxo-1,2-dihidropiridin-3-carbonitril (3,6 g, 20 mmoli) în tetrahidrofuran (50 ml) a fost degazat sub vid și purtat cu azot (3 cicluri). Complexul dimetilsulfură de boran (10 M, 8,0 mL, 80 mmol) a fost apoi adăugat lent la 0 °C înainte ca amestecul de reacție să fie încălzit la 70 °C și agitat timp de 2 ore. S-a adăugat lent metanol (15 ml) la 0 °C pentru a stinge reacția înainte ca amestecul să fie concentrat sub presiune redusă pentru a da compusul din titlu (3,8 g, brut), sub formă de solid galben deschis, care a fost utilizat în etapa următoare fără purificare ulterioară. LCMS [M+H]⁺ m/z: calculat 185,1; găsit 185,0.

Etapă 5: Sinteza terț-butil ((6-metil-4-(metiltio)-2-oxo-1,2-dihidropiridin-3-il)metil)carbamat

La o soluție de 3-(aminometil)-6-metil-4-(metiltio)piridin-2(1H)-onă (3,6 g, 20 mmol) în tetrahidrofuran (80 mL) s-a adăugat trietilamină (5,9 g, 8,1 mL, 59 mmol). Amestecul a fost agitat timp de 30 de minute înainte de a fi adăugat dicarbonat de di-terț-butil (6,4 g, 29 mmol) și reacția a fost agitată la 25°C timp de 12 ore. Amestecul de reacție a fost apoi concentrat la sec sub presiune redusă, înainte de a fi adăugată apă (35 mL) și produsul dorit a fost extras cu un amestec 5:1 de eter de petrol/acetat de etil (30 mL x 3). Straturile organice combinate au fost uscate pe sulfat de sodiu și concentrate pentru a da compusul din titlu (5,8 g, brut) ca un solid alb, care a fost utilizat în etapa următoare fără purificare suplimentară. LCMS [M+H]⁺ m/z: calculat 285,12; găsit 284,9. ¹H RMN (400 MHz, Dimetilsulfoxid-*d*₆) δ 6,05 (s, 1 H), 4,03 - 4,00 (m, 2H), 2,42 (s, 3H), 2,15 (s, 3H), 1,39 (s, 9H).

Etapă 6: Sinteza 3-(aminometil)-6-metil-4-(metiltio)piridin-2(1H)-onă (sare clorhidrat)

La o soluție de acid clorhidric în 1,4-dioxan (4 M, 100 mL, 400 mmol) la 25 °C s-a adăugat terț-butil ((6-metil-4-(metiltio)-2-oxo-1,2-dihidropiridin-3-il)metil)carbamat (5,0 g, 17,6 mmol). Amestecul de reacție a fost agitat la 25 °C timp de 2 ore apoi concentrat la sec sub presiune redusă. Reziduul a fost spălat cu diclormetan (30 mL x 2) și acetat de etil (30 mL) pentru a da compusul din titlu (4,5 g, brut, sare HCl) ca un solid galben, care a fost utilizat în etapa următoare fără purificare suplimentară. LCMS [M+H]⁺ m/z: calculat 185,1; găsit 185,0. ¹H RMN (400 MHz, D₂O) δ 6,31 (s, 1 H), 4,03 (s, 2H), 2,41 (s, 3H), 2,18 (s, 3H).

Intermediar 2: 5-(aminometil)-2-metil-6-(metiltio)pirimidin-4(3H)-onă (sare clorhidrat)**Etapă 1: Sinteza metil 2-ciano-3,3-bis(metiltio)acrilat**

O suspensie de hidruură de sodiu (60% dispersie în ulei mineral) (4,23 g, 106 mmol) în tetrahidrofuran (400 mL) a fost răcită la 0°C înainte de a fi adăugat prin picurare cianoacetat de metil (8,90 mL, 101 mmol). Amestecul de reacție a fost agitat energic timp de 15 minute înainte să fie adăugată prin picurare disulfură de carbon (6,1 ml, 101 mmol), menținând temperatura de reacție sub 20°C (produsul semisolid alb a devenit galben). Apoi s-a adăugat iodmetan (15,7 mL, 252 mmol) prin picurare și amestecul de reacție s-a agitat la temperatura camerei timp de 15 minute. Reacția a fost apoi concentrată sub presiune redusă și reziduul a fost turnat în apă cu gheață. Precipitatul rezultat a fost filtrat și uscat sub vid pentru a da compusul din titlu (11,9 g, randament 58%) sub formă de solid galben/maron, care a fost utilizat în etapa următoare fără purificare suplimentară. ¹H RMN (400 MHz, Cloroform-*d*) δ 3,83 (s, 3H), 2,76 (s, 3H), 2,61 (s, 3H).

Etapă 2: Sinteza 2-metil-4-(metiltio)-6-oxo-1,6-dihidropirimidin-5-carbonitril

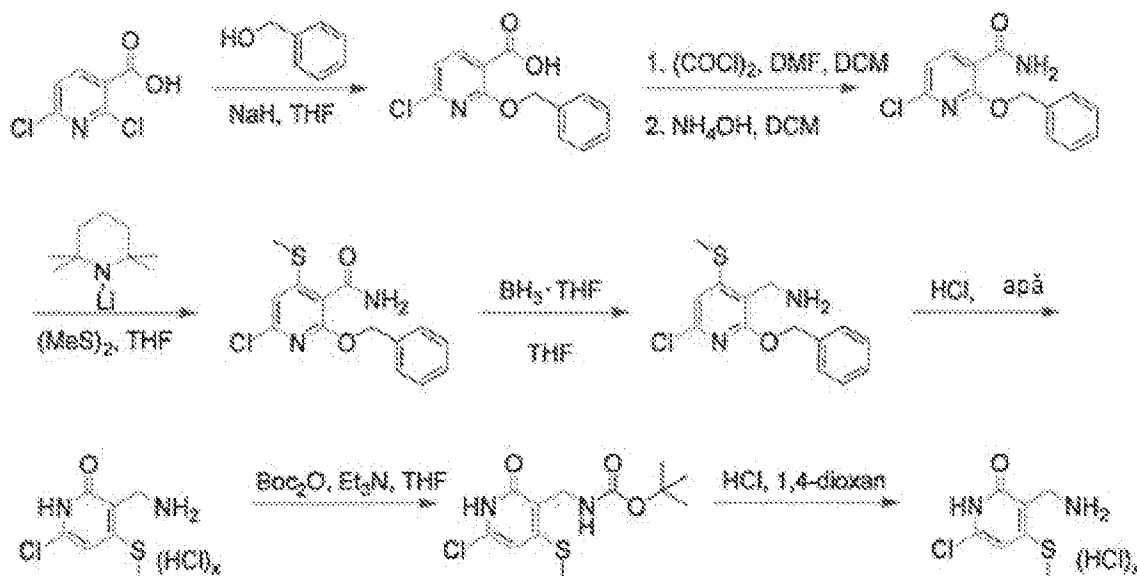
2-ciano-3,3-bis(metiltio)acrilat (11,9 g, 58,5 mmol) a fost dizolvat în etanol (1000 mL). Clorhidrat de acetamidină (5,53 g, 58,5 mmoli) și trietilamină (36,7 ml, 263 mmoli) au fost adăugate la amestec și agitate la reflux peste noapte. Apoi reacția a fost concentrată sub presiune redusă și reziduul a fost spălat cu acid clorhidric 10%. Precipitatul a fost filtrat, iar turta de filtrare a fost spălată cu apă și dietil eter înainte de a fi uscată sub vid pentru a da compusul din titlu (5 g, randament 47%) ca solid, care a fost utilizat în etapa următoare fără purificare suplimentară. LCMS $[M+H]^+$ m/z: calculat 182,03; găsit 182,10. ^1H RMN (400 MHz, Dimetilsulfoxid - d_6) δ 2,57 (s, 3H), 2,37 (s, 3H).

Etapă 3: Sinteza *terț* butil ((2-metil-4-(metiltio)-6-oxo-1,6-dihidropirimidin-5-il)metil)carbamat

La o suspensie de 2-metil-4-(metiltio)-6-oxo-1,6-dihidropirimidin-5-carbonitril (1,5 g, 8,27 mmol) în tetrahidrofuran (50 mL) la 0°C s-a adăugat o soluție hidrură de aluminu litiu în tetrahidrofuran (2 M, 6,2 mL, 12,4 mmol). Reacția a fost încălzită lent la temperatura camerei și odată terminată s-a stins cu o soluție apoasă de hidroxid de sodiu (1 M, 33 mL, 33,1 mmol). La acest amestec s-au adăugat secvențial 1,4-dioxan (50 mL) și di-*terț*-butildicarbonat (3,61 g, 16,6 mmol). Amestecul bifazic a fost agitat energic până la protejarea completă a aminei. Amestecul bifazic a fost acidulat la pH neutru cu acid acetic, separat și stralut apos a fost extras cu diclormetan. Straturile organice combinate au fost uscate pe sulfat de magneziu, filtrate și concentrate la sec sub presiune redusă. Reziduul a fost triturat cu diclormetan și filtratul (conținând produsul dorit) concentrat la sec sub presiune redusă. Solidul rezultat a fost purificat prin cromatografie rapidă în fază inversă (coloană C18, gradient 5% până la 95% acetonitril în apă tamponată cu acid trifluoracetic 0,1%) apoi prin cromatografie rapidă în fază normală (silicagel, gradient 30% până la 90% acetat de etil în diclormetan) pentru a da compusul din titlu (2,57 g, randament 26%, puritate >99%) ca un solid alb. LCMS $[M-(C_4H_8)+H]^+$ m/z: calculat 230,1; găsit 230,0. ^1H RMN (400 MHz, Cloroform- d) δ 13,20 (s, 1 H), 5,37 (t, $J = 5,5$ Hz, 1 H), 4,26 (d, $J = 5,6$ Hz, 2H), 2,51 (s, 3H), 2,44 (s, 3H), 1,44 (s, 9H).

Etapă 4. Sinteza 5-(aminometil)-2-metil-6-(metiltio)pirimidin-4(3H)-onă (sare clorhidrat)

La o suspendare a *terț*-butil ((2-metil-4-(metiltio)-6-oxo-1,6-dihidropirimidin-5-il)metil)carbamat de (300 mg, 1,05 mmol) în 1,4-dioxan (7,2 mL) la 23°C s-a adăugat o soluție de acid clorhidric în 1,4-dioxan (4 M, 2,10 mL, 8,40 mmol). Reacția s-a agitat la 23°C timp de 3 ore, apoi s-a adăugat mai multă soluție de acid clorhidric în 1,4-dioxan (4 M, 2,10 mL, 8,40 mmol). După 14 ore, reacția a fost apoi concentrată la sec sub presiune redusă pentru a da compusul din titlu (254 mg, randament 94%) ca un solid alb, care a fost utilizat în etapa următoare fără purificare suplimentară. LCMS $[M+Na]^+$ (bază liberă) m/z: calculat 208,1; găsit 208,1.

Intermediar 3: 3-(aminometil)-6-clor-4-(metiltio)piridin-2(1H)-onă (sare clorhidrat)**Intermediar 3**

Etapă 1: Sinteza acidului 2-(benziloxi)-6-cloronicotinic

La o suspensie de hidruură de sodiu (60% dispersie în ulei mineral) (11,5 g, 286 mmol) în tetrahidrofuran (500 mL) s-a adăugat alcool benzilic (14 mL, 143 mmol) la 0°C. Amestecul de reacție a fost agitat timp de 20 de minute, apoi a fost adăugată o soluție de acid 2,6-diclorpiridin-3-carboxilic (25 g, 130 mmoli) în tetrahidrofuran (500 ml) și amestecul de reacție a fost agitat timp de 4 ore la 23 °C. Reacția a fost apoi stinsă cu acid clorhidric 10% (300 ml), tratată cu NaHCO₃ solid până la pH ~8, acidulat cu acid acetic (50% în apă) și în final extras cu acetat de etil (200 ml x 3). Straturile organice combinate au fost spălate cu saramură (200 ml), uscate pe sulfat de magneziu, filtrate și concentrate la sec. Reziduul a fost purificat prin cromatografie rapidă (silicagel, gradient 5% până la 50% acetat de etil în diclormetan) pentru a da compusul din titlu (33,68 g, randament 98%).

Etapă 2: Sinteza 2-(benziloxi)-6-cloronicotinamidă

La o soluție de acid 2-(benziloxi)-6-cloronicotinic (33,68 g, 128,2 mmol) în diclormetan (500 mL) la 0 °C s-a adăugat N,N-dimetilformamidă (1 mL) urmată de clorură de oxalil (11,9 mL, 141 mmol). Reacția a fost agitată la 23°C timp de 2 ore apoi concentrată la sec. Reziduul a fost dizolvat în diclormetan (200 ml) și adăugat lent la o soluție concentrată de hidroxid de amoniu (50 ml) la 0 °C. După 1 oră, stratul organic a fost colectat și faza apoasă a fost extrasă cu diclormetan (50 ml x 3). Straturile organice combinate au fost uscate pe sulfat de magneziu, filtrate și concentrate la sec sub presiune redusă. Reziduul a fost purificat prin cromatografie rapidă (silicagel, gradient 0% până la 50% acetat de etil în diclormetan) pentru a da compusul din titlu ca solid (randament cantitativ).

Etapă 3: Sinteza 2-(benziloxi)-6-clor-4-(metiltio)nicotinamidă

La o soluție de 2,2,6,6-tetrametilpiperidină (29,45 mL, 175,1 mmol) în tetrahidrofuran (300 mL) la -78 °C s-a adăugat o soluție de n-butillitium în hexan (2,5 M, 70 mL, 175,1 mmol). Amestecul de reacție a fost încălzit la 0 °C timp de 30 de minute, apoi a fost răcit înapoi la -78 °C. S-a adăugat apoi o soluție de 2-(benziloxi)-6-cloronicotinamidă (11,5 g, 43,8 mmol) în tetrahidrofuran (100 mL) menținând temperatura internă sub -60 °C. Amestecul de reacție s-a agitat timp de 1 oră la -78 °C apoi s-a adăugat dimetildisulfură (15,77 mL, 175,1 mmol). Reacția a fost agitată la -78 °C timp de încă 2 ore, apoi stinsă la -78 °C cu o soluție de acid acetic în apă (50% v/v). Produsul dorit a fost extras cu acetat de etil (100 ml x 3) și straturile organice combinate au fost spălate cu apă (20 ml), o soluție apoasă saturată de bicarbonat de sodiu (20 ml), saramură (20 ml), uscate pe sulfat de magneziu, filtrate și concentrate la sec sub presiune redusă. Reziduul a fost purificat prin cromatografie rapidă (silicagel, gradient 0% până la 20% acetat de etil în diclormetan) pentru a se obține compusul din titlu (4,86 g, randament 36%).

Etapă 4: Sinteza 2-(benziloxi)-6-clor-4-(metiltio)piridin-3-il)metanamină

La o soluție de 2-(benziloxi)-6-clor-4-(metiltio)nicotinamidă (4,86 g, 15,7 mmol) în tetrahidrofuran (100 mL) la 23 °C s-a adăugat o soluție de boran în tetrahidrofuran (1 M, 63 ml, 63 mmol). Amestecul de reacție a fost agitat la reflux timp de 15 ore apoi stins prin adăugare lentă de metanol la temperatura camerei. Amestecul de reacție a fost concentrat la sec sub presiune redusă și reziduul a fost purificat prin cromatografie rapidă (silicagel, gradient 0% până la 30% metanol în diclormetan) pentru a da compusul din titlu (710 mg, randament 15%) ca un solid alb.

Etapă 5: Sinteza 3-(aminometil)-6-clor-4-(metiltio)piridin-2(1H)-onă (sare clorhidrat)

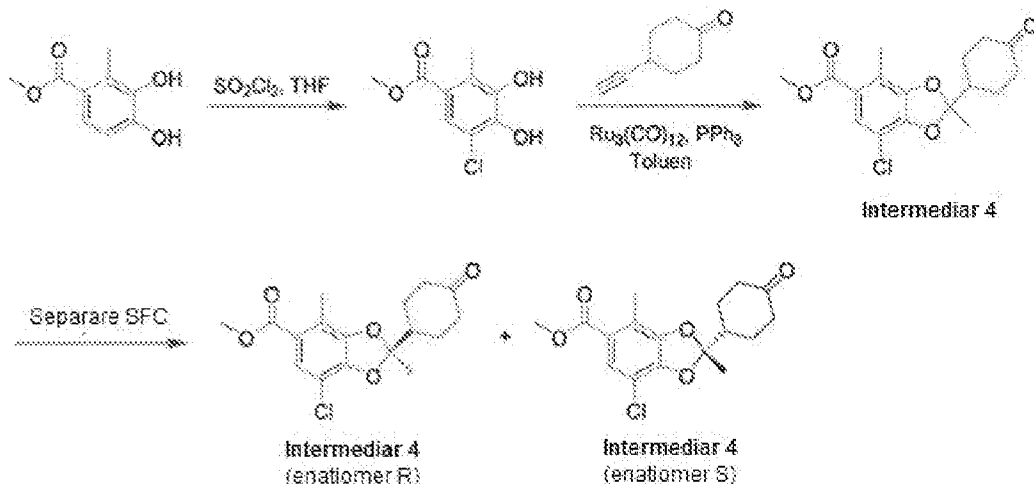
Într-un balon care conține 2-(benziloxi)-6-clor-4-(metiltio)piridin-3-il)metanamină (710 mg, 2,41 mmol) s-a adăugat acid clorhidric concentrat (12 M, 5,0 mL, 60 mmol). Amestecul de reacție a fost agitat la 23°C timp de 2 ore apoi concentrat la sec sub presiune redusă. Reziduul a fost recristalizat dintr-un amestec de metanol și dietil eter pentru a da compusul din titlu (400 mg, randament 69%) ca un solid alb.

Etapă 6: Sinteza terț-butil ((6-clor-4-(metiltio)-2-oxo-1,2-dihidropiridin-3-il)metil)carbamate

La o suspensie de 3-(aminometil)-6-clor-4-(metiltio)piridin-2(1H)-onă sare clorhidrat (1,575 g, 6,53 mmol) în diclormetan (50 mL) s-a adăugat di-terț-butildicarbonat (2,85 g, 13,1 mmoli) urmat de N,N-diizopropiletilamină (3,4 ml, 19,6 mmoli) la temperatura camerei. Reacția a fost agitată la temperatura camerei timp de 3 ore (până la dizolvare completă) apoi s-a stins cu apă. Stratul organic a fost separat, uscat pe sulfat de magneziu, filtrat și concentrat la sec sub presiune redusă. Reziduul a fost purificat prin cromatografie rapidă (silicagel, gradient 0 până la 10% metanol în diclormetan) pentru a da compusul din titlu sub formă de solid alb (1,5 g, randament 75%). LCMS [M+H]⁺ m/z: calculat 305,1; găsit 305,1.

Etapă 7: Sinteza 3-(aminometil)-6-clor-4-(metiltio)piridin-2(1H)-onă (sare clorhidrat)

La o suspensie de terț-butil (((6-clor-4-(metiltio)-2-oxo-1,2-dihidropiridin-3-il)metil)carbammat (300 mg, 984 μmol) în 1,4-dioxan (4,9 mL) sa adăugat o soluție de acid clorhidric în 1,4-dioxan (4 M, 1,96 mL, 7,87 mmol) la temperatura camerei. Reacția a fost agitată la temperatura camerei timp de 3 ore, apoi a fost adăugată mai multă soluție de acid clorhidric în 1,4-dioxan (4 M, 1,96 mL, 7,87 mmol). După 14 ore, reacția a fost concentrată la sec sub presiune redusă pentru a da compusul din titlu (253 mg, randament cantitativ) ca un solid alb, care a fost utilizat în etapa următoare fără purificare suplimentară. LCMS [M+Na]⁺ (bază liberă) m/z: calculat 227,0; găsit 227,0.

Intermediar 4: metil 7-clor-2,4-dimetil-2-(4-oxociclohexil)benzo[d][1,3]dioxol-5-carboxilat**Etapă 1: Sinteza metil 5-clor-3,4-dihidroxi-2-metilbenzoat**

La o soluție de metil 3,4-dihidroxi-2-metilbenzoat (5,11 g, 27,9 mmol) în tetrahidrofuran (199 mL) la -20°C s-a adăugat prin picurare clorură de sulfură (2,45 mL, 30,6 mmol). Amestecul de reacție a fost agitat la -20 °C timp de 3 ore apoi stins cu o soluție apoasă saturată de clorură de amoniu (50 ml). Produsul dorit a fost extras cu acetat de etil (25 ml x 3). Straturile organice combinate au fost spălate cu saramură (25 ml), uscate pe sulfat de sodiu, filtrate și concentrate la sec sub presiune redusă. Reziduul a fost purificat prin cromatografie rapidă (silicagel, gradient 0% până la 60% acetat de etil în heptan) pentru a da compusul din titlu (4,117 g, randament 68%) sub forma unui solid bej. LCMS [M+H]⁺ m/z: calculat 217,0; găsit 217,1 (model izotop C1).

Etapă 2: Sinteza metil 7-clor-2,4-dimetil-2-(4-oxociclohexil)-2H-1,3-benzodioxol-5-carboxilat

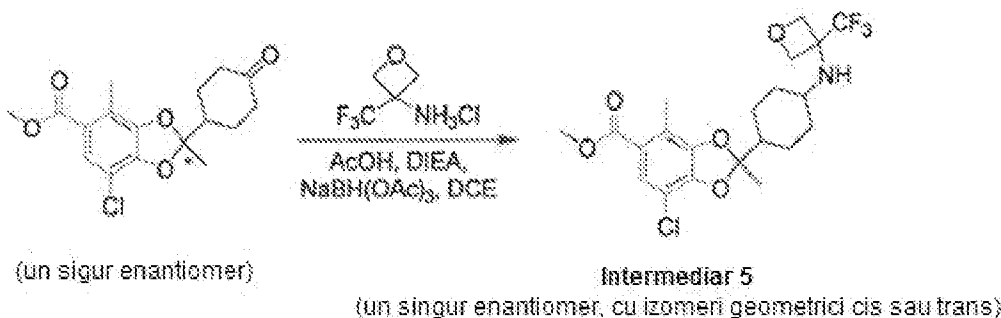
Un amestec de metil 5-clor-3,4-dihidroxi-2-metilbenzoat (1,2 g, 5,53 mmol), triruteniu dodecacarbonil (176 mg, 276 μmol) și trifenilfosfină (145 mg, 553 μmol) a fost degazat sub vid și purtat cu azot (3 cicluri). S-a adăugat toluen (8,1 mL) și amestecul de reacție a fost încălzit la reflux timp de 30 de minute. O soluție de 4-etinilciclohexan-1-onă (1,34 g, 11,0 mmol) în toluen (17 mL) a fost apoi adăugată prin picurare și reacția a fost agitată timp de 23 ore la reflux. În final, amestecul de reacție a fost răcit la temperatura camerei și concentrat la sec sub presiune redusă. Reziduul a fost purificat prin cromatografie rapidă (silicagel, gradient de la 0 la 60% acetat de etil în heptan) pentru a da compusul din titlu (1,327 g, randament 70%) sub formă de ulei galben. LCMS [M+Na]⁺ m/z: calculat 361,1; găsit 361,1 (model izotop C1).

Etapă 3: Separare metil (R)-7-clor-2,4-dimetil-2-(4-oxociclohexil)benzo[d][1,3]dioxol-5-carboxilat și (S)-7-clor de metil-2,4-dimetil-2-(4-oxociclohexil)benzo[d][1,3]dioxol-5-carboxilat

Amestecul racemic de metil-7-clor-2,4-dimetil-2-(4-oxociclohexil)benzo[d][1,3]dioxol-5-carboxilat (4,4 g, 13 mmol) a fost dizolvat prin SFC preparativă [Coloana: ChiralPak AY de la industria chimică Daicel (250 mm × 50 mm I.D., 10 μm). Faza mobilă A: CO₂/Faza mobilă B: 0,1% NH₄OH în metanol. Izocratic (85% faza mobilă A și 15% faza mobilă B). Debit: 80 ml/min. Temperatura coloanei: 40 °C]. Intermediar 4 (Vârful 1) (enantiomer/distomer nedorit): Timp de retenție = 6,2 min. Recuperare = 1,4 g, 4,05 mmol, randament 31%, ee 90%, puritate 98% (solid galben). ¹H RMN (400 MHz, Cloroform-d) δ 7,48 (s, 1 H), 3,78 (s, 3H), 2,44 - 2,36 (m, 2H), 2,35 - 2,25 (m, 6H), 2,19 (tdd, J= 2,8, 5,6, 13,1 Hz,

2H), 1,70 - 1,57 (m, 5H). Intermediarul 4 (Vârful 2) (enantiomer/eutomer dorit): Timp de retenție = 7,0 min. Recuperare = 1,1 g, 3,08 mmol, 23,75% randament, 99% ee, 95% puritate (solid galben). ¹H RMN (400 MHz, Cloroform-*d*) δ 7,49 (s, 1 H), 3,78 (s, 3H), 2,44 - 2,36 (m, 2H), 2,36 - 2,25 (m, 6H), 2,19 (td, *J* = 2,8, 5,6, 13,1 Hz, 2H), 1,72 - 1,59 (m, 5H). Metoda analitică SFC: [Coloană: ChiralPak AY-3 (150×4,6 mm I.D., 3 μm). Faza mobilă A: CO₂/Faza mobilă B: 0,05% Et₂NH în iPrOH. Gradient: de la 5 la 40% din faza mobilă B (peste 5,5 min). Debit: 2,5 ml/min. Temperatura coloanei: 40 °C]. Intermediarul 4 (Vârful 1 - enantiomer/distomer nedorit): Timp de retenție = 2,853 min. Intermediarul 4 (Vârful 2 - enantiomer/eutomer dorit): Timp de retenție = 2,979 min.

10 **Intermediarul 5: metil 7-clor-2,4-dimetil-2-(trans-4-((3-(trifluormetil)oxetan-3-il)amino)ciclohexil)benzo[d][1,3]dioxol-5-carboxilat**

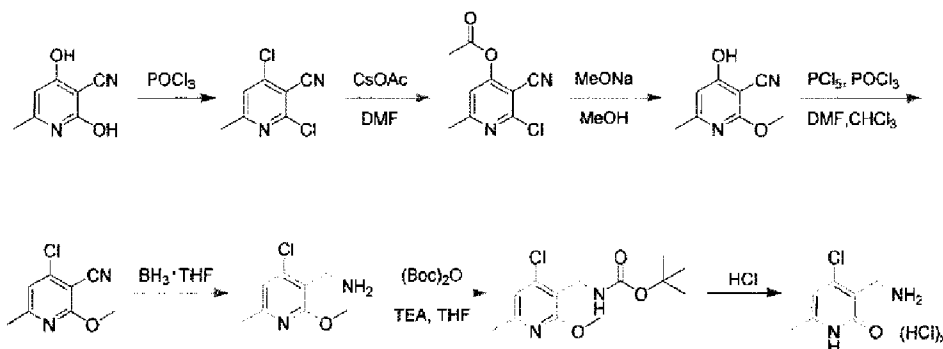


15 Un amestec de 1-clor-N-[3-(trifluormetil)oxetan-3-il]hidrogenamină (678 mg, 3,82 mmol) și N,N-diizopropiletilamină (698 μL, 4,01 mmol) în dicloroetan (9,54 mL) a fost agitat la temperatura camerei timp de 30 de minute înainte să se adauge la acest amestec de reacție acid acetic (218 μL, 3,82 mmol) urmat de metil-7-clor-2,4-dimetil-2-(4-oxociclohexil)benzo[d][1,3]dioxol-5-carboxilat (650 mg, 1,91 mmol). După 5 minute la temperatura camerei, amestecul a devenit limpede (galben/maron) și s-a adăugat triacetoxiborohidru de sodiu (404 mg, 1,91 mmol). Reacția a fost agitată timp de 3 ore la temperatura camerei apoi stinsă cu o soluție apoasă saturată de bicarbonat de sodiu (30 mL). Produsul dorit a fost extras cu diclorometan (30 ml x 3) și straturile organice combinate au fost uscate pe sulfat de sodiu, filtrate și concentrate la sec sub presiune redusă. Reziduul a fost purificat prin cromatografie rapidă cu fază inversă (coloană C18, acetonitril/apă 1:1 cu acid trifluoracetic 0,1%) pentru a da doi izomeri geometrici (cis și trans). Primul vârf de eluare corespunde izomerului geometric 1.

Metoda analitică LCMS (pentru izomeri geometrici)

[Coloană: Zorbax SB-C8 (75 × 4,6 mm I.D., 3,5 μm). Faza mobilă A: acid trifluoracetic 0,1% în acetonitril/Faza mobilă B: acid trifluoracetic în apă. Gradient: de la 5 la 100 % din faza mobilă B (peste 3,0 min) urmată de 100 % din faza mobilă B (4,5 min). Debit: 1,5 ml/min. Temperatura coloanei: 20 °C.] Izomer geometric 1 (dorit): Timp de retenție = 4,073 min (278 mg, 31 %). Izomer geometric 2 (nedorit): Timp de retenție = 4,277 min (253 mg 29 %).

Enantiomerii izomerului geometric 1 (dorit pe baza metodei LCMS) au fost separați prin SFC preparativă [Coloană: Chiralcel OX-H (250 × 21 mm I.D.). Faza mobilă A: CO₂/Faza mobilă B: 0,25% izopropilamină într-un amestec izopropanol/hexan 1:1. Izocratic (85% faza mobilă A și 15% faza mobilă B). Debit: 80 g/min. Temperatura coloanei: 25 °C]. Intermediar 5 (Vârf 1): Timp de retenție = 1,84 min. LCMS [M+H]⁺ m/z: calculat 464,15; găsit 464. Intermediar 5 (Vârf 2): Timp de retenție = 2,1 min. LCMS [M+H]⁺ m/z: calculat 464,15; găsit 464,2.

Intermediar 6: 3-(aminometil)-4-clor-6-metilpiridin-2(1H)-onă

5

Etapă 1: Sinteza 2,4-diclor-6-metilnicotinonitril

O soluție de 2,4-dihidroxi-6-metilnicotinonitril (80 g, 533,3 mmol) în oxiclurură de fosfor (150 mL) a fost agitată la 120 °C timp de 2 ore, apoi stinsă cu o soluție apoasă saturată de bicarbonat de sodiu (până la pH = 8). Aceasta a fost împărțită între apă (2000 ml) și acetat de etil (1000 ml), stratul organic a fost uscat pe sulfat de sodiu, filtrat și concentrat la sec sub presiune redusă pentru a da compusul din titlu (85 g, randament 86%) sub formă de solid de culoare maron, care a fost utilizat în etapa următoare fără purificare suplimentară. LCMS [M+H]⁺ m/z: calculat 186,98; găsit 186,6.

10

Etapă 2: Sinteza 2-clor-4-hidroxi-6-metilnicotinonitril

La o soluție de 2,4-diclor-6-metilnicotinonitril (10 g, 53 mmol) în N,N-dimetilformamidă (50 mL) s-a adăugat acetat de cesiu (30,8 g, 160 mmol) la temperatura camerei. Reacția a fost agitată la 80 °C peste noapte apoi stinsă cu apă (800 mL). Produsul dorit a fost extras cu acetat de etil (800 ml) și stratul organic a fost uscat pe sulfat de sodiu, filtrat și concentrat la sec sub presiune redusă. Compusul din titlu (8,8 g, randament 98%) a fost obținut ca un solid maron și utilizat în etapa următoare fără purificare suplimentară. LCMS [M+H]⁺ m/z: calculat 169,01; găsit 168,8.

20

Etapă 3: Sinteza 4-hidroxi-2-metoxi-6-metilnicotinonitril

Un amestec de 2-clor-4-hidroxi-6-metilnicotinonitril (8,8 g, 52,2 mmol) și metoxid de sodiu (14,1 g, 261 mmol) în metanol (50 ml) a fost agitat la 60 °C peste noapte. Amestecul a fost stins cu o soluție 1 M de acid clorhidric până la pH = 5. Acesta a fost împărțit între apă (500 ml) și acetat de etil (500 ml), stratul organic a fost uscat pe sulfat de sodiu și concentrat pentru a da compusul din titlu (8,0 g, randament 93%) ca solid maron, care a fost utilizat în etapa următoare fără purificare suplimentară. LCMS [M+H]⁺ m/z: calculat 165,1; găsit 164,8.

25

Etapă 4: 4-clor-2-metoxi-6-metilnicotinonitril

Un amestec de 4-hidroxi-2-metoxi-6-metilnicotinonitril (8,0 g, 48,7 mmol), pentaclorură de fosfor (20,3 g, 97,5 mmol), oxiclurură de fosfor (14,9 g, 9,09 mL, 97,5 mmol) și N,N-dimetilformamidă (5 mL) în cloroform (100 mL) a fost agitat la 60 °C timp de 30 min. Reacția a fost stinsă cu soluție apoasă saturată de bicarbonat de sodiu (până la pH = 8). Amestecul a fost împărțit între apă (1000 ml) și acetat de etil (1000 ml), stratul organic a fost uscat pe sulfat de sodiu și concentrat până la sec pentru a da compusul din titlu (8,0 g, randament 90%) ca un solid maron, care a fost utilizat în etapa următoare direct fără purificare ulterioară. LCMS [M+H]⁺ m/z: calculat 183,0; găsit 182,8.

35

Etapă 5: Sinteza (4-clor-2-metoxi-6-metilpiridin-3-il)metanamină

La o soluție de 4-clor-2-metoxi-6-metilnicotinonitril (8,0 g, 43,8 mmol) în tetrahidrofuran (50 mL) s-a adăugat complex de boran dimetilsulfură (10 M, 5,3 mL, 53 mmol). Amestecul a fost agitat la 60 °C timp de 2 ore, apoi stins cu metanol (10 ml) la 0 °C. Amestecul a fost concentrat la sec sub presiune redusă pentru a da titlul (7,0 g, randament 93%) ca un solid maron, care a fost utilizat în etapa următoare direct fără purificare suplimentară. LCMS [M+H]⁺ m/z: calculat 187,1; găsit 187,1.

45

Etapă 6: terț-butil ((4-clor-2-metoxi-6-metilpiridin-3-il)metil)carbammat

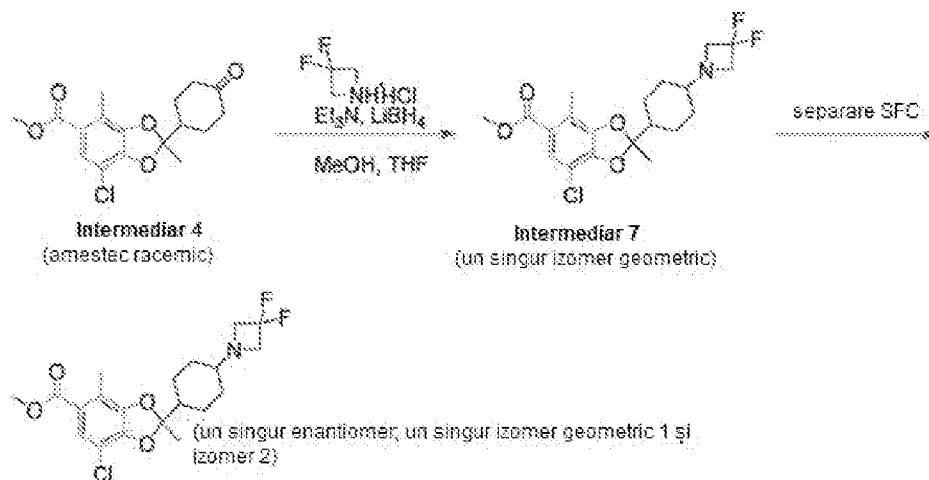
Un amestec de (4-clor-2-metoxi-6-metilpiridin-3-il)metanamină (7,0 g, 37,5 mmol), dicarbonat de di-terț-butil (15,2 g, 75,0 mmol) și trietilamină (11,4 g, 15,7 mL, 113 mmol) în tetrahidrofuran (50 mL) a fost agitat la 20 °C timp de 16 ore apoi stins cu apă (500 mL). Produsul dorit a fost extras cu acetat de etil

(500 ml) și stratul organic a fost uscat pe sulfat de sodiu, filtrat și concentrat la sec sub presiune redusă. Reziduul a fost purificat prin coloană rapidă (coloană cu silicagel, eter de petrol: acetat de etil 40:1) pentru a da compusul din titlu (3,0 g, randament 28%) sub formă de ulei incolor. LCMS $[M+H]^+$ m/z: calculat 287,1; găsit 286,9.

5 Etapa 7: 3-(aminometil)-4-clor-6-metilpiridin-2(1H)-onă

La o soluție de acid clorhidric în apă (4 M, 10 ml, 10 mmoli) s-a adăugat terț-butil ((4-clor-2-metoxi-6-metilpiridin-3-il)metil)carbammat (3,0 g, 10,5 mmoli) la temperatura camerei. Reacția a fost încălzită la 100 °C timp de 2 ore, apoi concentrată la sec sub presiune redusă pentru a da compusul din titlu (1,7 g, randament 94%) ca un solid galben. LCMS $[M+H]^+$ m/z: calculat 173,04; găsit 173,1. ^1H RMN (400 MHz, Metanol- d_4): δ 6,38 (s, 1 H), 4,15 (s, 2H), 2,32 (s, 3H).

15 Intermediar 7: metil 7-clor-2-(4-(3,3-difluoroazetidină-1-il)ciclohexil)-2,4-dimetilbenzo[d][1,3]dioxol-5-carboxilat



20 Etapa 1: Sinteza metil 7-clor-2-(4-(3,3-difluoroazetidină-1-il)ciclohexil)-2,4-dimetilbenzo[d][1,3]dioxol-5-carboxilat

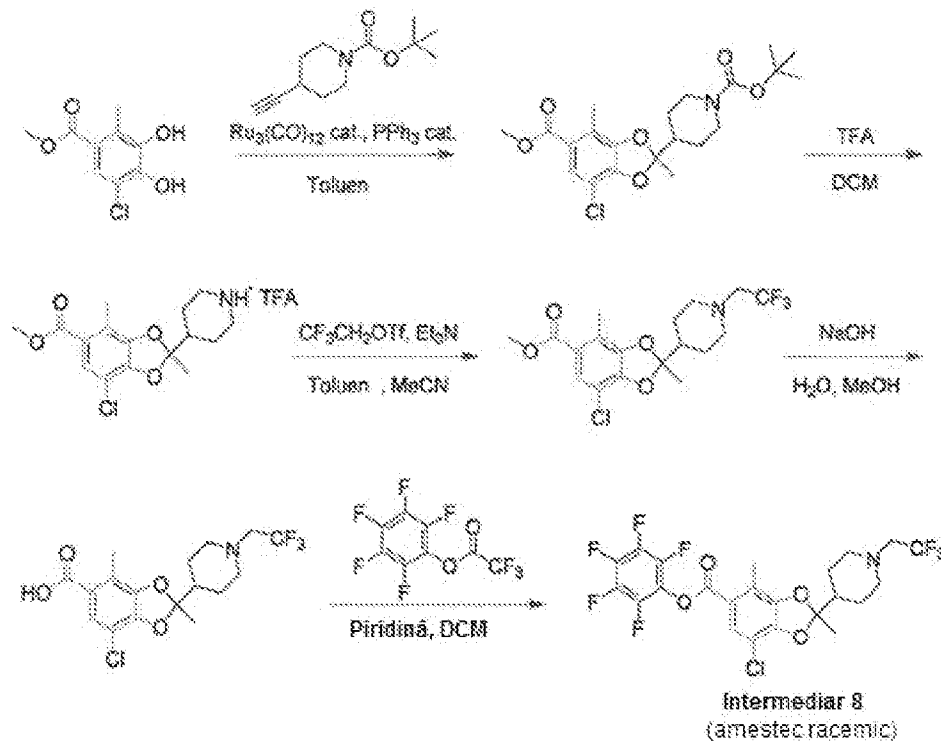
O soluție de metil 7-clor-2,4-dimetil-2-(4-oxociclohexil)benzo[d][1,3]dioxol-5-carboxilat (Intermediar 4 - amestec racemic) 550 mg, 1,62 mmol), 3,3-difluoroazetidină sare clorhidrat (839 mg, 6,48 mmoli) și trietilamină (895 μ L, 6,64 mmoli) în metanol (5 ml) și tetrahidrofuran (5 ml) au fost agitate peste noapte la temperatura camerei. A doua zi, reacția a fost răcită la -78 °C și s-a adăugat prin picurare o soluție de borohidru de litu (2 M în tetrahidrofuran, 1,21 mL, 2,43 mmol). Amestecul vâscos de culoare galbenă a fost încălzit treptat la temperatura camerei, apoi stins cu o soluție apoasă saturată de carbonat de sodiu la 0 °C. Produsul dorit a fost extras cu diclormetan (de trei ori) și straturile organice combinate au fost uscate pe sulfat de sodiu, filtrate și concentrate la sec sub presiune redusă. Reziduul a fost purificat de două ori prin cromatografie rapidă (coloană cu silicagel KP-NH, gradient 0 până la 20% acetat de etil în heptan) pentru a da compusul din titlu (354 mg, randament 53%) ca un amestec racemic dintr-un izomer geometric unic (cis sau trans). LCMS $[M+H]^+$ m/z: calculat 416,9; găsit 416,2.

35 Etapa 2: Separare metil (2R)-7-clor-2-(4-(3,3-difluoroazetidină-1-il)ciclohexil)-2,4-dimetilbenzo[d][1,3]dioxol-5-carboxilat și metil (2S)-7-clor-2-(4-(3,3-difluoroazetidină-1-il)ciclohexil)-2,4-dimetilbenzo[d][1,3]dioxol-5-carboxilat

Amestecul racemic de metil 7-clor-2-(4-(3,3-difluoroazetidină-1-il)ciclohexil)-2,4-dimetilbenzo[d][1,3]dioxol-5-carboxilat (560 mg) a fost separat prin SFC preparativă [Coloană: Chiralpak AD-H de la industria chimică Daicel. Faza mobilă A: CO₂/Faza mobilă B: 0,25% izopropilamină într-un amestec de hexan și etanol (1:1). Izocratic (90% faza mobilă A și 10% faza mobilă B). Debit: 80 g/min. Temperatura coloanei: 25 °C]. Metoda analitică SFC: Coloană: Chiralpak AD-H de la industria chimică Daicel (100 mm $\times$ 4,6 mm. Faza mobilă A: CO₂/Faza mobilă B: 0,1% izopropilamină într-un amestec de hexan și etanol (3:1). Izocratic (85% faza mobilă A și 15% faza mobilă B: 4 mL/min, 15% randament, 96% ee. ^1H RMN (400 MHz, Cloroform- d) δ 7,48 (s, 1 H), 3,78 (s, 3H), 2,44 - 2,36 (m, 2H), 2,35 - 2,25 (m, 6H), 2,19 (tdd, J = 2,8, 5,6, 13,1 Hz, 2H), 1,70 - 1,57 (m, 5H). Intermediar 7 (Vârf 2): Timp de retenție =

1,16 min (metoda analitică SFC). Recuperare = 150 mg, 13% randament, 97% ee. LCMS $[M+H]^+$ m/z: calculat 416,86; găsit 416,2.

Intermediarul 8: perfluorfenil 7-clor-2,4-dimetil-2-(1-(2,2,2-trifluoretil)piperidin-4-il)benzo[d][1,3]dioxol-5-carboxilat



Etapa 1: Sinteza terț-butil 4-(7-clor-5-(metoxycarbonil)-2,4-dimetilbenzo[d][1,3]dioxol-2-il)piperidin-1-carboxilat

Într-un balon profil pară de 100 ml echipat cu un condensator, un amestec de metil 5-clor-3,4-dihidroxi-2-metilbenzoat (1,219 g, 5,58 mmol), trifenilfosfină (146 mg, 0,558 mmol) și triruteniu dodecacarbonil (178 mg, 0,279 mmol) s-a purjat cu cicluri de azot/vid (4 cicluri), apoi s-a adăugat toluen (12 mL), s-a purjat cu cicluri de azot/vid apoi s-a agitat la 120°C timp de 30 min. La amestecul de culoare închisă a fost adăugat un amestec de terț-butil 4-etinilpiperidin-1-carboxilat (2,32 g, 11,1 mmol) în toluen (10 mL). Soluția portocalie rezultată a fost agitată timp de încă 2 ore la 120 °C. Amestecul de reacție a fost concentrat sub presiune redusă apoi purificat prin cromatografie rapidă (silicagel, gradient de la 0 la 100% acetat de etil în heptan) pentru a da compusul din titlu (2,33 g, 98%) sub formă de ulei galben. LCMS $[M+Na]^+$ m/z: calculat 448,2; găsit 448,2.

Etapa 2: Sinteza metil 7-clor-2,4-dimetil-2-(piperidin-4-il)benzo[d][1,3]dioxol-5-carboxilat (sarea acidului trifluoracetic)

La o soluție galbenă de terț-butil 4-[7-clor-5-(metoxycarbonil)-2,4-dimetil-2H-1,3-benzodioxol-2-il]piperidin-1-carboxilat (2,33 g, 5,47 mmol) în diclorometan (2 mL) s-a adăugat TFA (1 mL). După 30 de minute, amestecul de reacție a fost concentrat sub presiune redusă pentru a da compusul din titlu (2,40 g, cantitativ) ca o gumă care a fost utilizată în etapa următoare fără purificare suplimentară. LCMS $[M+H]^+$ m/z: calculat 326,79; găsit 326,2.

Etapa 3: Sinteza metil 7-clor-2,4-dimetil-2-(1-(2,2,2-trifluoretil)piperidin-4-il)benzo[d][1,3]dioxol-5-carboxilat

La o soluție de metil 7-clor-2,4-dimetil-2-(piperidin-4-il)-2H-1,3-benzodioxol-5-carboxilat, sare a acidului trifluoracetic (2,40 g, 5,45 mmol) în toluen (20 mL) și acetonitril (10 mL) s-au adăugat trietilamină (8 mL, 57,6 mmol) și trifluormetansulfonat de 2,2,2-trifluoretil (3,0 g, 12,9 mmol). După 3 ore, amestecul de reacție a fost concentrat sub presiune redusă. S-a adăugat apă (50 mL) și amestecul a fost extras cu EtOAc (30 mL x 3). Straturile organice combinate au fost spălate cu saramură (50 mL x 2), uscate pe sulfat de sodiu, filtrate și concentrate sub presiune redusă apoi purificate prin cromatografie rapidă (silicagel, gradient de

la 0 la 50% acetat de etil în heptan) pentru a da compusul din titlu (2,04 g, 92%) sub formă de ulei gălbui. LCMS $[M+H]^+$ m/z: calculat 408,81; găsit 408,2.

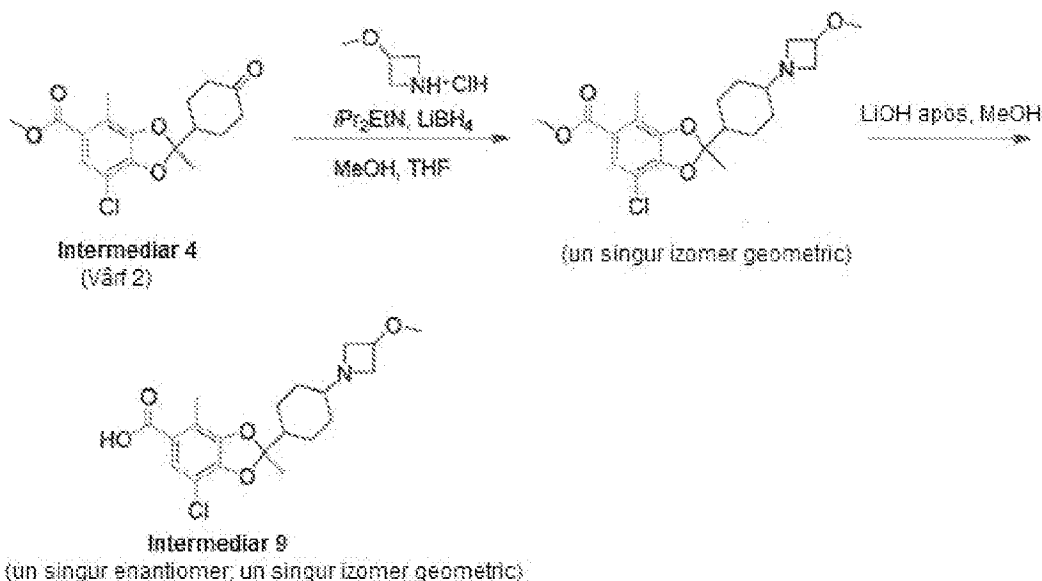
Etapă 4: Sinteza acidului 7-clor-2,4-dimetil-2-(1-(2,2,2-trifluoretil)piperidin-4-il)benzo[d][1,3]dioxol-5-carboxilic

La o soluție de metil 7-clor-2,4-dimetil-2-[1-(2,2,2-trifluoretil)piperidin-4-il]-2H-1,3-benzodioxol-5-carboxilat (691 mg, 1,69 mmol) în metanol (3 mL) s-a adăugat hidroxid de sodiu 6 M în apă (1 mL, 6,00 mmol) și s-a încălzit la 60°C. După 25 de minute, amestecul de reacție a fost concentrat sub presiune redusă pentru a îndepărta cea mai mare parte a metanolului. Amestecul a fost apoi diluat cu apă, răcit la 0°C apoi neutralizat la pH = 7 cu acid clorhidric 1 M. Amestecul a fost extras cu diclormetan (3 ori) și straturile organice combinate au fost uscate pe sulfat de sodiu, filtrate și concentrate sub presiune redusă pentru a da compusul din titlu ca un solid alb care a fost utilizat în etapa următoare fără purificare suplimentară. LCMS $[M+H]^+$ m/z: calculat 394,79; găsit 394,2.

Etapă 5: Sinteza perfluorfenil 7-clor-2,4-dimetil-2-(1-(2,2,2-trifluoretil)piperidin-4-il)benzo[d][1,3]dioxol-5-carboxilat

La o soluție agitată de acid 7-clor-2,4-dimetil-2-[1-(2,2,2-trifluoretil)piperidin-4-il]-2H-1,3-benzodioxol-5-carboxilic (665 mg, 1,68 mmol) în diclormetan (5 mL) s-a adăugat piridină (1 mL, 12,4 mmol) urmată de adăugarea de 2,3,4,5,6-pentafluorfenil 2,2,2-trifluoroacetat (500 μ L, 2,90 mmol). După 20 de minute, amestecul de reacție a fost concentrat sub presiune redusă pentru a da compusul din titlu care a fost utilizat în etapa următoare fără purificare suplimentară. LCMS $[M+H]^+$ m/z: calculat 560,84; găsit 560,2.

Intermediarul 9: acid 7-clor-2-(4-(3-metoxiazetidin-1-il)ciclohexil)-2,4-dimetilbenzo[d][1,3]dioxol-5-carboxilic



Etapă 1: Sinteza metil 7-clor-2-(4-(3-metoxiazetidin-1-il)ciclohexil)-2,4-dimetilbenzo[d][1,3]dioxol-5-carboxilat

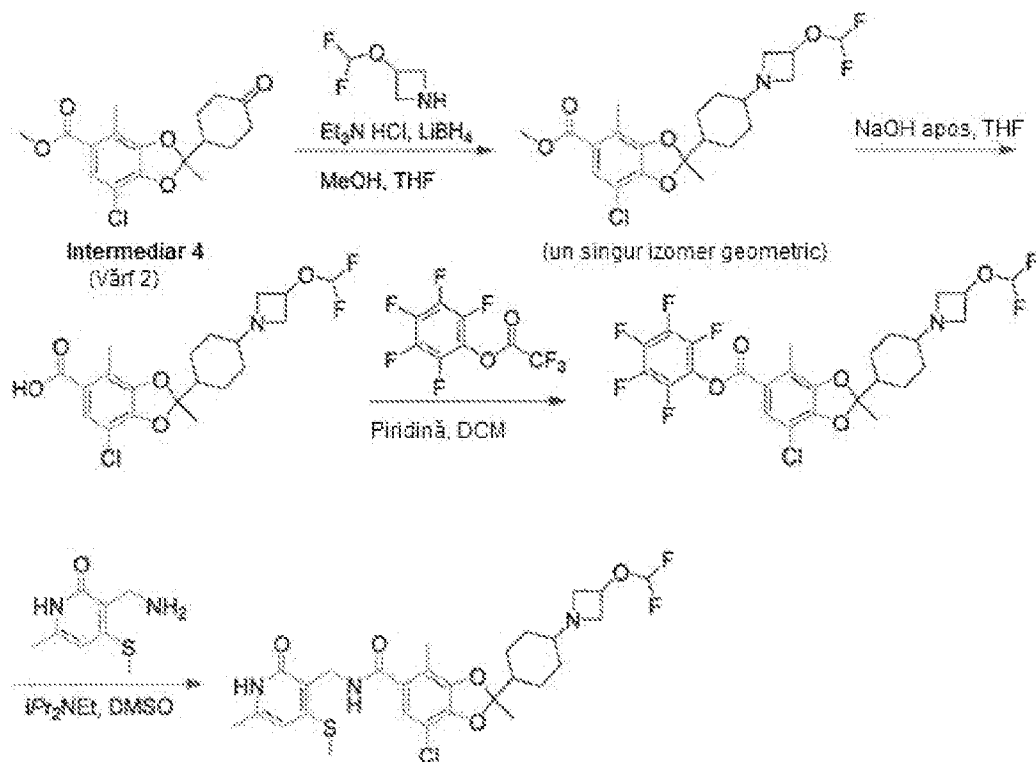
O soluție de 3-metoxiazetidină sare clorhidrat (8 g, 64,75 mmoli) și N,N-diizopropiletilamină (12 ml, 68,9 mmoli) în metanol (30 ml) a fost agitată la temperatura camerei timp de 30 de minute înainte de a se adăuga o altă soluție de metil 7-clor-2,4-dimetil-2-(4-oxociclohexil)-1,3-benzodioxol-5-carboxilat (Intermediarul 4 - Vârful 2) (4,1 g, 12,10 mmol) în tetrahidrofuran (30 mL). Amestecul de reacție a fost agitat la temperatura camerei timp de 1 oră apoi răcit la -70 °C. S-a adăugat borohidruură de litiu (500 mg, 22,96 mmol) și reacția a fost agitată la -70 °C timp de 30 de minute [sau până când s-a observat consumul complet al materiei prime prin TLC, acetat de etil/metanol 5:1]. Apoi, două loturi de reacție au fost combinate și stinse cu o soluție apoasă saturată de clorură de amoniu (120 ml) la 0 °C și produsul dorit a fost extras cu diclormetan (200 ml x 3). Straturile organice combinate au fost uscate pe sulfat de sodiu, filtrate și concentrate la sec sub presiune redusă. Reziduul a fost purificat prin cromatografie rapidă

(silicagel, gradient 0 până la 14% metanol în diclormetan) pentru a da compusul din titlu (8,05 g, randament 67%, puritate 83%) sub formă de ulei galben deschis. O probă (50 mg) a fost purificată în continuare prin cromatografie preparativă în strat subțire (silicagel, acetat de etil:metanol 15:1). LCMS $[M+H]^+$ m/z: calculat. 410,2; găsit 410,1. ^1H RMN (400 MHz, Metanol- d_4) δ 7,39 (s, 1 H), 3,95 - 3,91 (m, 1 H), 3,73 (s, 3H), 3,59 - 3,51 (m, 2H), 3,16 (s, 3H), 2,97 (br dd, J = 6,4, 8,0 Hz, 2H), 2,26 (s, 3H), 2,11 - 2,02 (m, 1 H), 1,91 - 1,73 (m, 5H), 1,54 (s, 3H), 1,22 - 1,12 (m, 2H), 0,98 - 0,86 (m, 2H).

Etapă 2: Sinteza acidului 7-clor-2-(4-(3-metoxiazetidin-1-il)ciclohexil)-2,4-dimetilbenzo[d][1,3]dioxol-5-carboxilic

La o soluție de metil 7-clor-2-(4-(3-metoxiazetidin-1-il)ciclohexil)-2,4-dimetilbenzo[d][1,3]dioxol-5-carboxilat (4 g, 9,75 mmol) în metanol (48 mL) s-a adăugat o soluție de hidroxid de litiu hidrat (4,03 g, 96,06 mmol) în apă (12 mL). Reacția a fost agitată la 70 °C timp de 2 ore, apoi două șarje au fost combinate și concentrate sub presiune redusă. S-a adăugat apă (50 mL) și pH-ul a fost ajustat la 6 cu o soluție apoasă saturată de acid citric la 0°C. Produsul dorit a fost extras cu un amestec 3:1 de diclormetan și izopropanol (300 ml x 5). Straturile organice combinate au fost uscate pe sulfat de sodiu, filtrate și concentrate la sec sub presiune redusă pentru a da compusul din titlu (6,1 g, brut) sub forma unui solid alb mat, care a fost utilizat în etapa următoare fără purificare suplimentară. LCMS $[M+H]^+$ m/z: calculat. 396,2; găsit 396,1. ^1H RMN (400 MHz, Metanol- d_4) δ 7,07 (s, 1 H), 4,05 - 4,10 (m, 2H), 3,76 - 3,88 (m, 1 H), 3,67 (br dd, J = 10, 3,6 Hz, 2H), 3,22 (s, 3H), 2,71 - 2,81 (m, 1 H), 2,19 (s, 3H), 1,91 - 1,99 (m, 4H), 1,75 - 1,85 (m, 1H), 1,52 (s, 3H), 1,18 - 1,28 (m, 2H), 1,06 - 1,14 (m, 2H).

Exemplul #1: 7-clor-2-(4-(3-(difluormetoxi)azetidin-1-il)ciclohexil)-2,4-dimetil-N-((6-metil-4-(metiltio)-2-oxo-1,2-dihidropiridin-3-il)metil)benzo[d][1,3]dioxol-5-carboxamidă



Etapă 1: Sinteza metil 7-clor-2-(4-(3-(difluormetoxi)azetidin-1-il)ciclohexil)-2,4-dimetilbenzo[d][1,3]dioxol-5-carboxilat

O soluție de metil 7-clor-2-(4-(3-(difluormetoxi)azetidin-1-il)ciclohexil)-2,4-dimetilbenzo[d][1,3]dioxol-5-carboxilat (Intermediar 4 - Vârful 2) (224 mg, 0,661 mmol), 3-(difluorometoxi)azetidină (336 mg, 2,72 mmol) și trietilamină sare clorhidrat (373 mg, 2,71 mmol) într-un amestec de metanol (2 ml) și tetrahidrofuran (2 ml) au fost agitate la temperatura camerei timp de 1,5 ore, apoi răcite până la -78 °C. O soluție de borohidru de litiu în tetrahidrofuran (2 M, 500 μ L, 1 mmol) a fost adăugată prin picurare la -78 °C înainte

ca reacția să fie lăsată să se încălzească la temperatura camerei timp de 15 min. Apoi, amestecul a fost răcit la 0°C apoi stins cu o soluție apoasă saturată de bicarbonat de sodiu, diluat cu diclormetan și încălzit la temperatura camerei. Produsul dorit a fost extras din stratul apos cu diclormetan (de trei ori) iar straturile organice combinate au fost uscate folosind un filtru hidrofob și concentrate la sec sub presiune redusă. Reziduul a fost purificat prin cromatografie rapidă (silicagel, gradient 10 până la 100% acetat de etil în heptan apoi 0 până la 100% etanol în acetat de etil) pentru a da un singur izomer geometric (cis sau trans) al compusului din titlu (205 mg, 70 % Randament). LCMS $[M+H]^+$ m/z: calculat 445,9; găsit 446,2.

Etapă 2: Sinteza acidului 7-clor-2-(4-(3-(difluormetoxi)azetidină-1-il)ciclohexil)-2,4-dimetilbenzo[d][1,3]dioxol-5-carboxilic

La o soluție de metil 7-clor-2-(4-(3-(difluormetoxi)azetidină-1-il)ciclohexil)-2,4-dimetilbenzo[d][1,3]dioxol-5-carboxilat (205 mg, 0,460 mmol) în metanol (3 mL) s-a adăugat o soluție de hidroxid de sodiu în apă (6 M, 1 mL, 6,00 mmol). Reacția a fost încălzită la 60 °C timp de 20 de minute, apoi diluată cu apă, răcită la 0 °C, acidulată la pH = 2 cu acid clorhidric 1 M și apoi neutralizată la pH = 7 cu o soluție apoasă de hidroxid de sodiu 1 M. Produsul dorit a fost extras cu diclormetan (de trei ori), uscat folosind un filtru hidrofob și concentrat la sec sub presiune redusă pentru a da compusul din titlu (176 mg, randament 89 %) ca un solid alb care a fost utilizat în etapa următoare fără purificare suplimentară. LCMS $[M+H]^+$ m/z: calculat 431,9; găsit 432,2.

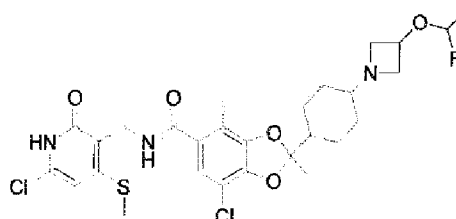
Etapă 3: Sinteza perfluorfenil 7-clor-2-((1R,4R)-4-(3-(difluormetoxi)azetidină-1-il)ciclohexil)-2,4-dimetilbenzo[d][1,3]dioxol-5-carboxilat

La o soluție de acid 7-clor-2-(4-(3-(difluormetoxi)azetidină-1-il)ciclohexil)-2,4-dimetilbenzo[d][1,3]dioxol-5-carboxilic (176 mg, 0,408 mmol) în diclormetan (0,5 mL) s-a adăugat piridină (1,0 mL, 12,4 mmol) urmată de adăugarea de 2,3,4,5,6-pentafluorfenil 2,2,2-trifluoracetat (150 μL, 0,871 mmol) la temperatura camerei. După 20 de minute, amestecul de reacție a fost concentrat la sec sub presiune redusă pentru a da un amestec de compus din titlu (randament teoretic 100% = 243 mg) și produse secundare. Amestecul brut a fost utilizat în etapa următoare fără purificare suplimentară. LCMS $[M+H]^+$ m/z: calculat 597,91; găsit 598,2.

Etapă 4: Sinteza 7-clor-2-(4-(3-(difluormetoxi)azetidină-1-il)ciclohexil)-2,4-dimetil-N-((6-metil-4-(metiltio)-2-oxo-1,2-dihidropiridin-3-il)metil)benzo[d][1,3]dioxol-5-carboxamidă

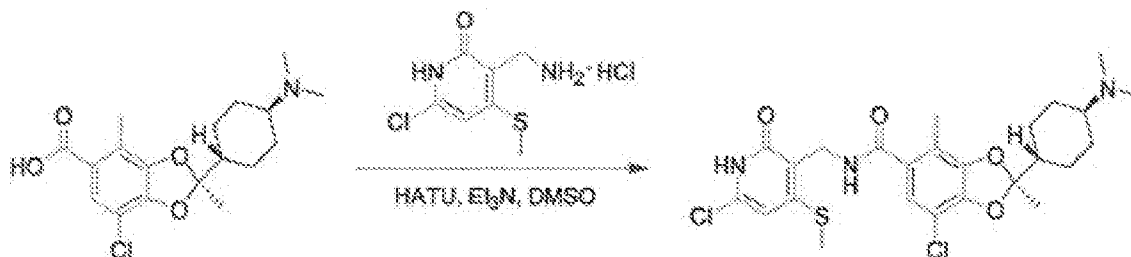
La o soluție de perfluorfenil 7-clor-2-(4-(3-(difluormetoxi)azetidină-1-il)ciclohexil)-2,4-dimetilbenzo[d][1,3]dioxol-5-carboxilat (≤ 243) mg, $\leq 0,406$ mmol) în dimetilsulfoxid (1 mL) s-au adăugat 3-(aminometil)-6-metil-4-(metiltio)piridin-2(1H)-onă (sare clorhidrat) (Intermediar 1) (222 mg, 1,20 mmol) și N,N-diizopropiletilamină (0,30 mL, 1,71 mmol). Amestecul de reacție a fost agitat la 60°C timp de 1 oră, apoi concentrat la sec sub un flux puternic de azot peste noapte. Reziduul a fost purificat de două ori prin cromatografie rapidă cu fază inversă (coloană C18, gradient de la 0 la 100% acetonitril în apă cu 0,1% acid trifluoracetic). Reziduul a fost diluat cu diclormetan și o soluție saturată de bicarbonat de sodiu. Stratul apos a fost spălat cu diclormetan. Straturile organice combinate au fost uscate pe sulfat de sodiu și concentrate sub presiune redusă pentru a da compusul din titlu (166 mg, randament 68 % în două etape) ca un singur izomer geometric (cis sau trans). LCMS $[M+H]^+$ m/z: calculat 598,1; găsit 598,3. ^1H RMN (400 MHz, Metanol- d_4) δ 6,88 (s, 1 H), 6,26 (s, 1 H), 6,38 (t, $J = 74,3$ Hz, 2 H), 4,71 (cvin., $J = 6,0$ Hz, 1 H), 4,48 (s, 2 H), 3,69 - 3,60 (m, 2 H), 3,18 - 3,11 (m, 2 H), 2,52 (s, 3 H), 2,29 (s, 3 H), 2,18 (s, 3 H), 2,10 (tt, $J = 3,5, 11,2$ Hz, 1 H), 1,98 - 1,86 (m, 4 H), 1,85 - 1,78 (m, 1 H), 1,60 (s, 3 H), 1,32 - 1,21 (m, 2 H), 1,06 - 0,92 (m, 2 H).

Tabelul 1. Următorul compus a fost preparat într-o manieră similară cu exemplul 1 utilizând materia primă adecvată.

Exemplu	Structură	Date analitice
2	 (un singur enantiomer; un singur izomer geometric)	LCMS $[M+H]^+$ m/z: calculat 618,1; găsit 618,1. ^1H RMN (400 MHz, Cloroform-d) δ 6,91 - 6,88 (m, 1 H), 6,58 (t, $J = 5,4$ Hz, 1 H), 6,53 (s, 1 H), 6,39 - 5,97 (m, 2H), 3,80 (d, $J = 7,3$ Hz, 2H), 3,14 (d, $J = 6,4$ Hz, 2H), 2,53 - 2,49 (m, 3H), 2,26 (s, 3H), 2,13 (s l., 1H), 1,99 - 1,78 (m, 5H), 1,60 (s, 3H), 1,45 (d, $J = 3,4$ Hz, 1 H), 1,28 - 1,18 (m, 2H), 1,15 - 1,01 (m, 2H).

Exemplu	Structură	Date analitice
	Preparat din intermediarul 3 și intermediarul 4 (Vârful 2)	

Exemplul #3: (R)-7-clor-N-(((6-clor-4-(metiltio)-2-oxo-1,2-dihidropiridin-3-il)metil)-Z-(trans-4-(dimetilamino)ciclohexil)-2,4-dimetilbenzo[d][1,3]dioxol-5-carboxamidă



Exemplul 3

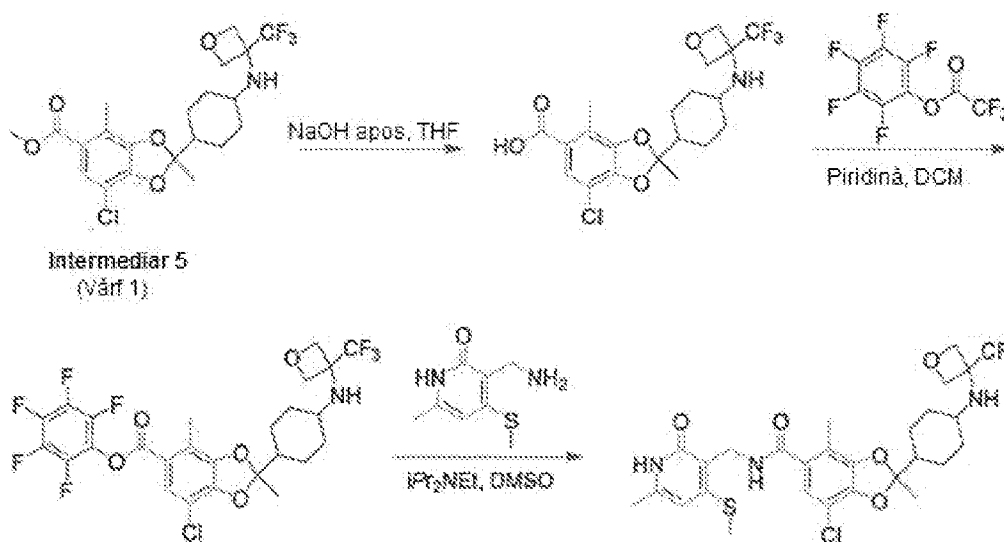
5 La o soluție de acid (R)-7-clor-2-(trans-4-(dimetilamino)ciclohexil)-2,4-dimetilbenzo[d][1,3]dioxol-5-carboxilic (preparat conform procedeului descris în cererea de brevet US2017/0073335 A1) (48 mg, 0,1356 mmol) în Dimetilsulfoxid (0,5 mL) s-au adăugat trietilamină (56,6 μL, 0,407 mmol) și O-(7-azabenzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-hexafluorofosfat de tetrametiluroniu (41,2 mg, 0,108 mmol) la temperatura camerei. Deoarece formarea esterului activat a fost incompletă prin LCMS ([M+H]⁺ m/z: 368,2) după 5 min, a fost adăugat de două ori suplimentar O-(7-azabenzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-hexafluorofosfat de tetrametiluroniu (16 mg, 0,042 mmol) în dimetilsulfoxid (1 mL). După finalizarea activării acidului, o suspensie de sare clorhidrat de 3-(aminometil)-6-clor-4-(metilsulfanil)-1,2-dihidropiridin-2-onă (65,3 mg, 0,271 mmol) și trietilamină (56,6 μL, 0,407 mmol) s-a adăugat în dimetilsulfoxid (0,5 mL) la temperatura camerei. Amestecul de reacție a fost încălzit la 60 °C timp de 45 de minute, apoi diluat cu diclormetan și apă. Stratul organic a fost uscat folosind un filtru hidrofoab și concentrat la sec sub presiune redusă. Reziduul a fost purificat prin cromatografie rapidă [coloană cu silicagel KP-NH, gradient 0 până la 100% acetat de etil în heptan, apoi 0 până la 100% etanol în diclormetan, apoi 0 până la 100% metanol (cu 20% hidroxid de amoniu) în acetat de etil] pentru a da compusul din titlu (30 mg, randament 41%) ca un solid alb. LCMS [M+H]⁺ m/z: calculat 540,5; găsit 540,2. ¹H RMN (400 MHz, Metanol-d₄) δ 6,89 (s, 1 H), 6,68 (s, 1 H), 4,50 (s, 2 H), 3,20 (tt, J = 3,2, 11,9 Hz, 1 H), 2,83 (s, 6H), 2,53 (s, 3H), 2,18 (s, 3H), 2,16 - 2,08 (m, 4H), 2,02 - 1,94 (m, 1H), 1,62 (s, 3H), 1,54 (dq, J = 3,4, 12,4 Hz, 2H), 1,47 - 1,37 (m, 2H).

25 **Tabelul 2.** Următorii compuși au fost preparați într-un mod similar cu Exemplul 3 utilizând materialul de pornire adecvat.

Exemplu	Structură	Date analitice
4	(enantiomer R; izomer geometric trans) Preparat din intermediarul 1	LCMS [M+H] ⁺ m/z: calculat 520,2; găsit 520,3. ¹ H RMN (400 MHz, Dimetilsulfoxid-d ₆) δ 11,52 (s 1, 1 H), 8,00 (t, J = 4,4 Hz, 1 H), 6,85 (s, 1 H), 6,08 (s, 1 H), 4,27 (d, J = 4,4 Hz, 2H), 3,57 (s, 1 H), 2,45 (s, 3H), 2,17 (s, 3H), 2,14 (s, 9H), 1,92 - 1,77 (m, 5H), 1,60 (s, 3H), 1,15 (t, J = 9,0 Hz, 4H)
5	(enantiomer R; izomer geometric trans)	LCMS [M+H] ⁺ m/z: calculat 521,2; găsit 521,2. RMN (400 MHz, Dimetilsulfoxid-d ₆) δ 12,60 - 12,19 (m, 2H), 8,05 (t, J = 4,4 Hz, 1 H), 6,87 (s, 1 H), 4,21 (d, J = 4,4 Hz, 2H), 2,47 (s, 3H), 2,29 (s, 2H), 2,19 - 2,12 (m, 9H), 2,09 (s, 1H), 1,94 - 1,76 (m, 5H), 1,60 (s, 3H), 1,15 (t, J = 9,5 Hz, 4H)

Exemplu	Structură	Date analitice
	Preparat din intermediarul 2	

Exemplul #6 (Enantiomer 1): 7-clor-N-((6-clor-4-(metiltio)-2-oxo-1,2-dihidropiridin-3-il)metil)-2-(4-(dimetilamino))ciclohexil)-2,4-dimetilbenzo[d][1,3]dioxol-5-carboxamidă



Exemplul #6 (Enantiomer 1)

(Un singur enantiomer, un singur izomer geometric)

5

Etapă 1: Sinteza acid 7-clor-2,4-dimetil-2-(4-((3-(trifluormetil)oxetan-3-il)amino)ciclohexil)benzo[d][1,3]dioxol-5-carboxilic

La o soluție de metil 7-clor-2,4-dimetil-2-[4-{{3-(trifluormetil)oxetan-3-il}amino}ciclohexil]-2H-1,3-benzodioxol-5-carboxilat (Intermediarul 5 - Vârful 1) (81 mg, 0,174 mmol) în metanol (1 mL) s-a adăugat hidroxid de sodiu (72 mg, 1,79 mmol). Amestecul de reacție s-a încălzit la 60 °C timp de 20 de minute, s-a răcit la 0 °C și apoi s-a acidulat la pH = 2 cu acid clorhidric 1 M. Produsul dorit a fost apoi extras cu diclormetan (de trei ori) iar straturile organice combinate au fost uscate folosind un filtru hidrofof. Filtratul a fost concentrat la sec sub presiune redusă pentru a da compusul din titlu (70 mg, randament 89%) ca un solid alb, care a fost utilizat în etapa următoare fără purificare suplimentară. LCMS [M+H]⁺ m/z: calculat 450,1; găsit 450,2.

15

Etapă 2: Sinteza perfluorfenil 7-clor-2,4-dimetil-2-(4-((3-(trifluormetil)oxetan-3-il)amino)ciclohexil)benzo[d][1,3]dioxol-5-carboxilat

La o soluție de acid 7-clor-2,4-dimetil-2-(4-((3-(trifluormetil)oxetan-3-il)amino)ciclohexil)benzo[d][1,3]dioxol-5-carboxilic (70 mg, 155 μmol) în diclormetan (0,5 mL) s-au adăugat piridină (24,9 μL, 310 μmol) și 2,3,4,5,6-pentafluorofenil 2,2,2-trifluoroacetat (39,8 μL, 232 μmol) la temperatura camerei. După 15 min, reacția a fost concentrată sub presiune redusă pentru a da un amestec de compus din titlu și produse secundare (68 mg, brut). Amestecul brut a fost utilizat în etapa următoare fără purificare suplimentară. LCMS [M+H]⁺ m/z: calculat 616,1; găsit 616,2.

25

Etapă 3: Sinteza 7-clor-2,4-dimetil-N-((6-metil-4-(metiltio)-2-oxo-1,2-dihidropiridin-3-il)metil)-2-(4-((3-(trifluormetil)oxetan-3-il)amino)ciclohexil)benzo[d][1,3]dioxol-5-carboxamidă

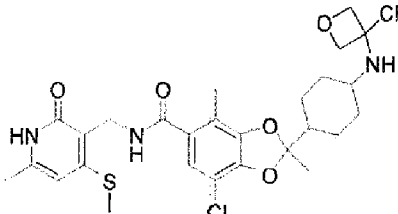
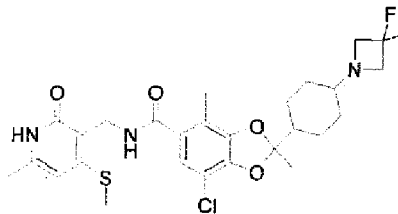
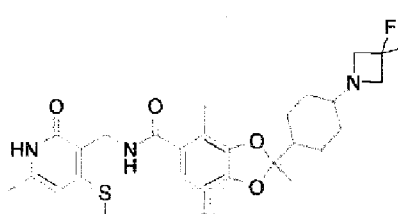
La o soluție de 2,3,4,5,6-pentafluorofenil 7-clor-2,4-dimetil-2-[4-{{3-(trifluormetil)oxetan-3-il}amino}ciclohexil]-2H-1,3-benzodioxol-5-carboxilat (≤68 mg, ≤110 μmol) în N,N-dimetilformamidă (1 mL) s-a adăugat 3-(aminometil)-6-metil-4-(metilsulfanil)-1,2-dihidropiridin-2-onă (bază liberă) (30,4 mg, 0,165 mmol) și N,N-diizopropiletilamină (0,1 mL, 574 μmol) la temperatura camerei. Reacția a fost agitată la 50 °C timp de 30 de minute, apoi adăugată direct pe o coloană C18 pentru purificare prin cromatografie rapidă cu fază inversă (coloană C18, gradient 5 până la 50 % acetonitril în apă cu acid trifluoroacetic 0,1%) pentru a da sarea acidului trifluoroacetic a compusului din titlu. Sarea a fost dizolvată în diclormetan și stratul organic a fost spălat cu o soluție apoasă saturată de bicarbonat de sodiu. În cele din urmă, stratul organic a fost concentrat la sec sub presiune redusă pentru a da compusul din titlu (bază liberă) (42 mg, randament

35

62 %) sub formă de solid alb. LCMS [M+H]⁺ m/z: calculat 616,19; găsit 616,3. ¹H RMN (400 MHz, Cloroform-*d*) δ 12,62 - 12,44 (m, 1 H), 7,16 (t, *J* = 5,1 Hz, 1 H), 6,91 (s, 1 H), 6,04 (s, 1 H), 4,76 (s, 3H), 4,62 - 4,46 (m, 4H), 2,72 - 2,63 (m, 1 H), 2,49 (s, 3H), 2,32 (s, 3H), 2,27 (s, 3H), 1,92 (d, *J*= 5,9 Hz, 4H), 1,80 (s, 3H), 1,92 (d, *J*= 5,9 Hz, 4H), 1,80 (s, 3H), 1,60 (s, 3H), 1,36 - 1,10 (m, 6H).

5

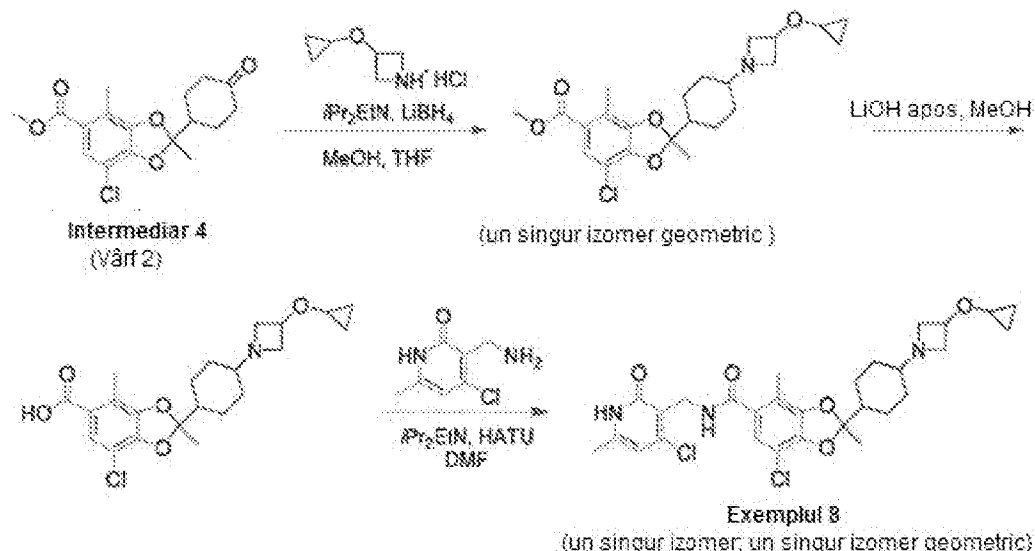
Tabelul 3. Următorii compuși au fost preparați într-un mod similar cu **Exemplul 6** folosind materialul de pornire adecvat.

Exemplu	Structură	Date analitice
6 (Enantiomer 2)	 (un singur enantiomer; un singur izomer geometric)	LCMS [M+H] ⁺ m/z: calculat 616,19; găsit 616,3. ¹ H RMN (400 MHz, Cloroform- <i>d</i>) δ 12,45 - 12,30 (m, 1 H), 7,14 (t, <i>J</i> = 5,4 Hz, 1 H), 6,91 (s, 1 H), 6,04 (s, 1 H), 4,75 (d, <i>J</i> = 7,3 Hz, 2H), 4,61 (s, 2H), 4,55 - 4,51 (m, 2H), 2,68 (t, <i>J</i> = 9,5 Hz, 1 H), 2,49 (s, 3H), 2,32 (s, 3H), 2,27 (s, 3H), 1,92 (d, <i>J</i> = 6,4 Hz, 4H), 1,83 (t, <i>J</i> = 11,7 Hz, 1 H), 1,61 (s, 3H), 1,35 - 1,12 (m, 6H).
	Preparat din intermediarul 1 și intermediarul 5 (Vârful 2)	
7 (Enantiomer 1)	 (un singur enantiomer; un singur izomer geometric)	LCMS [M+H] ⁺ m/z: calculat 568,2; găsit 568,3. ¹ H RMN (400 MHz, Metanol- <i>d</i> ₄) δ 6,93 - 6,84 (m, 1 H), 6,27 (s, 1 H), 4,48 (s, 2H), 3,67 (br t, <i>J</i> = 12,0 Hz, 4H), 2,52 (s, 3H), 2,29 (s, 3H), 2,26 - 2,19 (m, 1H), 2,18 (s, 3H), 2,02 - 1,81 (m, 5H), 1,61 (s, 3H), 1,34 - 1,21 (m, 2H), 1,13 - 1,00 (m, 2H).
	Preparat din intermediarul 1 și intermediarul 7 (Vârful 1)	
7 (Enantiomer 2)	 (un singur enantiomer; un singur izomer geometric)	LCMS [M+H] ⁺ m/z: calculat 568,2; găsit 568,3. ¹ H RMN (400 MHz, Metanol- <i>d</i> ₄) δ 6,89 (s, 1 H), 6,27 (s, 1 H), 4,49 (s, 2H), 3,61 (t, <i>J</i> = 12,0 Hz, 4H), 2,53 (s, 3H), 2,29 (s, 3H), 2,23 - 2,08 (m, 4H), 2,03 - 1,78 (m, 5H), 1,61 (s, 3H), 1,35 - 1,22 (m, 2H), 1,12-0,99 (m, 2H).
	Notă: Preparat din intermediarul 1 și intermediarul 7 (Vârful 2)	

10

15

20

Exemplul 8: 7-clor-N-((4-clor-6-metil-2-oxo-1,2-dihidropiridin-3-il)metil)-2-(4-(3-ciclopropoxiazetidin-1-il)ciclohexil)-2,4-dimetilbenzo[d][1,3]dioxol-5-carboxamidă

5

Etapa 1: Sinteza metil 7-clor-2-(4-(3-ciclopropoxiazetidin-1-il)ciclohexil)-2,4-dimetilbenzo[d][1,3]dioxol-5-carboxilat

O soluție de 3-(ciclopropoxi)azetidină sare clorhidrat (1,9 g, 12,7 mmol) și N,N-diizopropiletilamină (2,7 mL, 15,5 mmol) în metanol (10 mL) a fost agitată la temperatura camerei timp de 1 oră înainte de a se adăuga o altă soluție de metil 7-clor-2,4-dimetil-2-(4-oxociclohexil)-1,3-benzodioxol-5-carboxilat (Intermediar 4 - Vârful 2) (860 mg, 2,54 mmol) în tetrahidrofuran (30 mL). Amestecul de reacție a fost agitat la temperatura camerei timp de 1,5 ore apoi răcit la -70 °C. S-a adăugat borohidru de litiu (120 mg, 5,51 mmol) și reacția a fost agitată la -70 °C timp de 30 de minute [sau până când s-a observat consumul complet al materiei prime prin TLC, acetat de etil/metanol 5:1]. Apoi, reacția a fost stinsă cu o soluție apoasă saturată de clorură de amoniu (100 ml) și produsul dorit a fost extras cu acetat de etil (50 ml x 2). Straturile organice combinate au fost spălate cu saramură (30 mL), uscate pe sulfat de sodiu, filtrate și concentrate la sec sub presiune redusă. Reziduul a fost purificat prin cromatografie rapidă (silicagel, gradient 50 până la 100% acetat de etil în eter de petrol) pentru a da compusul din titlu (760 mg, randament 65%, puritate 95%) sub formă de ulei galben. LCMS [M+H]⁺ m/z: calculat. 436,1; găsit 436,0.

Etapa 2: Sinteza acidului 7-clor-2-(4-(3-ciclopropoxiazetidin-1-il)ciclohexil)-2,4-dimetilbenzo[d][1,3]dioxol-5-carboxilic

La o soluție de metil 7-clor-2-(4-(3-ciclopropoxiazetidin-1-il)ciclohexil)-2,4-dimetilbenzo[d][1,3]dioxol-5-carboxilat (760 mg, 1,74 mmol) în metanol (15 mL) și apă (3 mL) s-a adăugat hidroxid de litiu hidrat (962 mg, 22,93 mmol). Reacția a fost agitată la 70 °C timp de 15 ore, apoi concentrat sub presiune redusă. S-a adăugat apă (15 ml) și pH-ul a fost ajustat la 6 cu o soluție apoasă saturată de acid citric la 0°C. Produsul dorit a fost extras cu un amestec 10:1 de diclormetan și izopropanol (30 ml x 3). Straturile organice combinate au fost spălate cu saramură (150 ml x 2), uscate pe sulfat de sodiu, filtrate și concentrate la sec sub presiune redusă pentru a da compusul din titlu (720 mg, brut) ca un solid galben, care a fost utilizat în următorul pas fără purificare ulterioară. LCMS [M+H]⁺ m/z: calculat. 422,1; găsit 422,0.

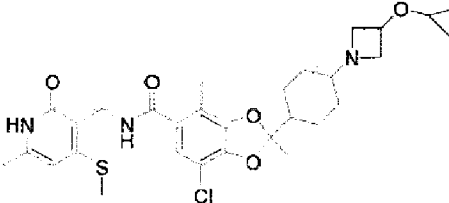
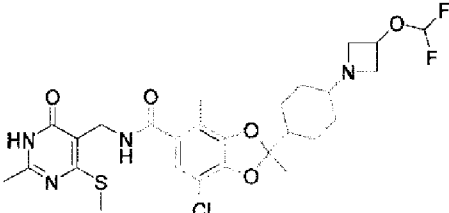
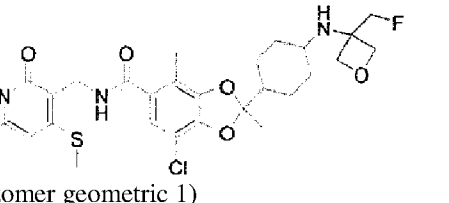
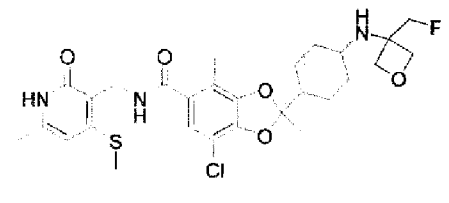
Etapa 3: Sinteza 7-clor-N-((4-clor-6-metil-2-oxo-1,2-dihidropiridin-3-il)metil)-2-(4-(3-ciclopropoxiazetidin-1-il)ciclohexil)-2,4-dimetilbenzo[d][1,3]dioxol-5-carboxamidă

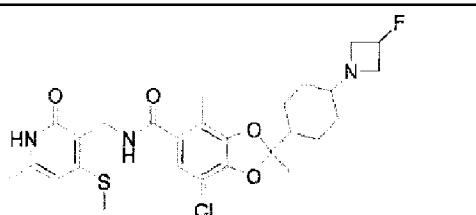
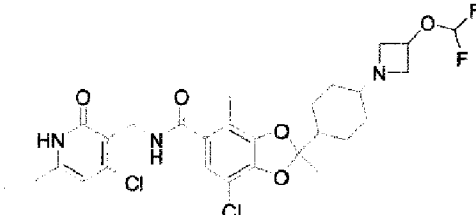
La o soluție de acid 7-clor-2-[4-[3-(ciclopropoxi)azetidin-1-il]ciclohexil]-2,4-dimetil-1,3-benzodioxol-5-carboxilic (360 mg, 0,853 mmol) în N,N-dimetilformamidă (4 mL) s-au adăugat O-(7-azabenzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-hexafluorofosfat de tetrametiluroniu (500 mg, 1,31 mmol) și N,N-diizopropiletilamină (1 ml, 5,74 mmol). Amestecul a fost agitat la 15°C timp de 30 min înainte de a fi adăugată 3-(aminometil)-4-clor-6-metil-1H-piridin-2-onă sare clorhidrat (Intermediarul 6) (250 mg, 1,2 mmol). Amestecul de reacție a fost agitat la 15 °C timp de încă 4 ore apoi filtrat. Filtratul a fost purificat prin HPLC preparativă [Coloană: Waters Xbridge (150 mm x 25 mm, 5 μm). Faza mobilă A: apă (0,05% hidroxid de amoniac v/v/Faza mobilă B: acetonitril. Gradient (65 până la 55% faza mobilă A/35 până la 65% faza mobilă B, timp de 9,5 min). Temperatura coloanei: 30 °C] pentru a da compusul din titlu (209

mg, randament 42%) ca un solid alb $[M+H]^+$ m/z: calculat, 576,2; găsit 576,2. ^1H RMN (400 MHz, Metanol- d_4) δ 6,90 (s, 1 H), 6,30 (s, 1 H), 4,52 (s, 2H), 4,22 (evin., $J = 6,0$ Hz, 1 H), 3,61 (dd, $J = 6,4, 8,6$ Hz, 2H), 3,31 - 3,25 (m, 1 H), 2,99 (dd, $J = 6,3, 8,4$ Hz, 2H), 2,28 (s, 3H), 2,20 (s, 3H), 2,12 - 2,04 (m, 1 H), 1,99 - 1,85 (m, 5H), 1,62 (s, 3H), 1,33 - 1,24 (m, 5H), 2H), 1,06 - 0,95 (m, 2H), 0,56 - 0,51 (m, 2H), 0,51 - 0,44 (m, 2H).

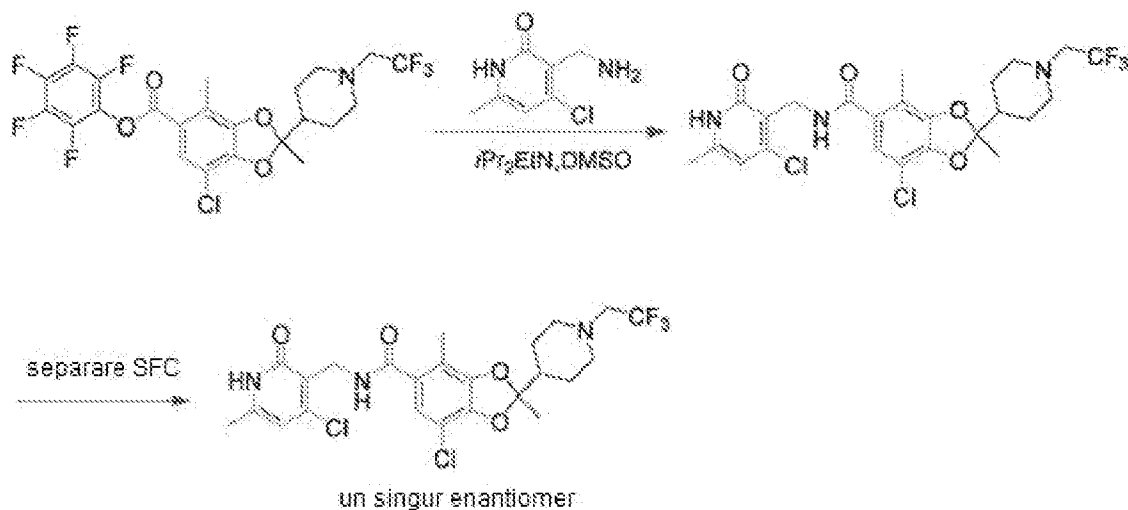
5

Tabelul 4. Următorii compuși au fost preparați într-un mod similar cu Exemplul 8 utilizând materialul de pornire adecvat

Exemplu	Structură	Date analitice
9	 (un singur enantiomer; un singur izomer geometric) Preparat din intermediarul 1 și intermediarul 4 (Vârful 2)	LCMS $[M+H]^+$ m/z: calculat 588,2; găsit 588,2. ^1H RMN (400 MHz, Metanol- d_4) δ 6,91 (s, 1 H), 6,29 (s, 1 H), 4,53 (s, 2 H), 4,26 - 4,17 (m, 1 H), 3,69 - 3,59 (m, 2H), 3,30 - 3,24 (m, 1 H), 3,06 - 2,94 (m, 2H), 2,54 (s, 3H), 2,31 (s, 3H), 2,21 (s, 3H), 2,10 - 2,02 (m, 1H), 1,99 - 1,80 (m, 5H), 1,62 (s, 3H), 1,35 - 1,18 (m, 2H), 1,08 - 0,93 (m, 2H), 0,58 - 0,50 (m, 2H), 0,50 - 0,42 (m, 2H).
10	 (un singur enantiomer; un singur izomer geometric) Preparat din intermediarul 2 și intermediarul 4 (Vârful 2)	LCMS $[M+H]^+$ m/z: calculat 599,2; găsit 599,1. ^1H RMN (400 MHz, Metanol- d_4) δ 6,92 (s, 1 H), 6,40 (t, $J = 76$ Hz, 1 H), 4,73 (t, $J = 8$ Hz, 1 H), 4,43 (s, 2H), 3,68 - 3,64 (m, 2H), 3,18 - 3,14 (m, 2H), 2,57 (s, 3H), 2,40 (s, 3H), 2,21 (s, 3H), 2,14 - 2,09 (m, 1 H), 1,97 - 1,83 (m, 5H), 1,62 (s, 3H), 1,32 - 1,23 (m, 2H), 1,05 - 0,95 (m, 2H).
11	 (izomer geometric 1) Preparat din intermediarul 1 și intermediarul 4 (Vârful 2)	LCMS $[M+H]^+$ m/z: calculat 580,2; găsit 580,2. ^1H RMN (400 MHz, Metanol- d_4) δ 6,91 (s, 1 H), 6,29 (s, 1 H), 4,82 - 4,79 (m, 1 H), 4,68 (s, 1 H), 4,55 (dd, $J = 4,0, 6,4$ Hz, 2H), 4,52 - 4,46 (m, 4H), 2,63 (br t, $J = 10,8$ Hz, 1 H), 2,55 (s, 3H), 2,31 (s, 3H), 2,21 (s, 3H), 1,94 (br d, $J = 13,2$ Hz, 2H), 1,89 - 1,80 (m, 3H), 1,62 (s, 3H), 1,31 (q, $J = 12,0$ Hz, 2H), 1,25 - 1,15 (m, 2H).
11	 (izomer geometric 2) Preparat din intermediarul 1 și intermediarul 4 (Vârful 2)	LCMS $[M+H]^+$ m/z: calculat 580,2; găsit 580,1. ^1H RMN (400 MHz, Metanol- d_4) δ 6,91 (s, 1 H), 6,30 (s, 1 H), 4,75 (s, 1 H), 4,63 (s, 1 H), 4,62 - 4,59 (m, 2H), 4,52 - 4,47 (m, 4H), 3,06 (s, 1 H), 2,55 (s, 3H), 2,31 (s, 3H), 2,22 (s, 3H), 1,91 (br d, $J = 10,4$ Hz, 1 H), 1,68 (br d, $J = 8,4$ Hz, 4H), 1,65 (s, 5H), 1,61 (s, 1 H), 1,57 (s, 1 H).

Exemplu	Structură	Date analitice
12	 (un singur enantiomer; un singur izomer geometric) Preparat din intermediarul 1 și intermediarul 4 (Vârful 2)	LCMS [M+H] ⁺ m/z: calculat 572,2; găsit 571,9. ¹ H RMN (400 MHz, Metanol-d ₄) δ 6,89 (s, 1 H), 6,27 (s, 1 H), 4,96 - 5,23 (m, 1 H), 4,48 (s, 2H), 3,54 - 3,69 (m, 2H), 3,18 - 3,30 (m, 2H), 2,52 (s, 3H), 2,29 (s, 3H), 2,19 (s, 3H), 2,06 - 2,15 (m, 1 H), 1,80 - 1,98 (m, 5H), 1,61 (s, 3H), 1,19 - 1,32 (m, 2H), 0,93 - 1,05 (m, 2H).
13	 (un singur enantiomer; un singur izomer geometric) Preparat din intermediarul 6 și intermediarul 4 (Vârful 2)	LCMS [M+H] ⁺ m/z: calculat 586,2; găsit 586,1. ¹ H RMN (400 MHz, Metanol-d ₄) δ 6,90 (s, 1 H), 6,40 (t, J = 76 Hz, 1 H), 6,30 (s, 1 H), 4,73 (t, J = 8 Hz, 1 H), 4,53 (s, 2H), 3,68 - 3,64 (m, 2H), 3,18 - 3,14 (m, 2H), 2,28 (s, 3H), 2,20 (s, 3H), 2,15 - 2,08 (m, 1 H), 1,97 - 1,83 (m, 5H), 1,63 (s, 3H), 1,35 - 1,23 (m, 2H), 1,05 - 0,90 (m, 2H).

Exemplul 14: (R)-7-clor-2,4-dimetil-N-((6-metil-4-(metiltio)-2-oxo-1,2-dihidropiridin-3-il)metil)-2-(1-(2,2,2-trifluoretil)piperidin-4-il)benzo[d][1,3]dioxol-5-carboxamidă și (S)-7-clor-2,4-dimetil-N-((6-metil-4-(metiltio)-2-oxo-1,2-dihidropiridin-3-il)metil)-2-(1-(2,2,2-trifluoretil)piperidin-4-il)benzo[d][1,3]dioxol-5-carboxamidă



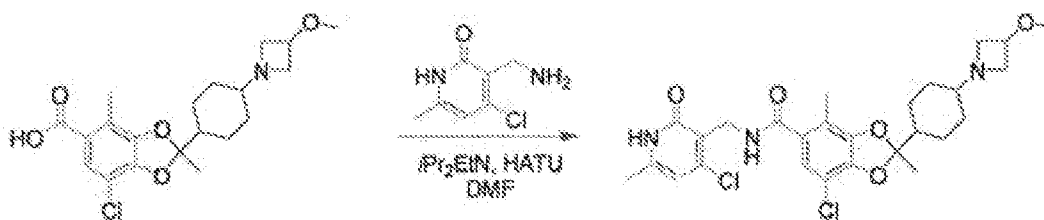
Etapa 1: Sinteza 7-clor-2,4-dimetil-N-((6-metil-4-(metiltio)-2-oxo-1,2-dihidropiridin-3-il)metil)-2-(1-(2,2,2-trifluoretil)piperidin-4-il)benzo[d][1,3]dioxol-5-carboxamidă

La o soluție de 2,3,4,5,6-pentafluorfenil 7-clor-2,4-dimetil-2-[1-(2,2,2-trifluoretil)piperidin-4-il]-2H-1,3-benzodioxol-5-carboxilat (Intermediar 8) (752 mg, 1,34 mmol) în dimetilsulfoxid (4 mL) s-au adăugat 3-(aminometil)-6-metil-4-(metilsulfani)-1,2-dihidropiridin-2-onă (Intermediar 1) (740 mg, 4,02 mmol) și N,N-diizopropiletilamină (932 μL, 5,36 mmol). Amestecul de reacție a fost încălzit la 60 °C și după 1 oră adăugat pe o coloană C18 pentru purificare. Produsul dorit a fost purificat de două ori prin cromatografie rapidă cu fază inversă (coloană C18, gradient de la 0 la 100% acetonitril în apă cu 0,1% acid trifluoracetic) pentru a da compusul din titlu (289 mg, randament 38%) ca un amestec racemic sub formă de gumă.

Etapa 2: Separarea (R)-7-clor-2,4-dimetil-N-((6-metil-4-(metiltio)-2-oxo-1,2-dihidropiridin-3-il)metil)-2-(1-(2,2,2-trifluoretil)piperidin-4-il)benzo[d][1,3]dioxol-5-carboxamidă și (S)-7-clor-2,4-dimetil-N-((6-metil-4-(metiltio)-2-oxo-1,2-dihidropiridin-3-il)metil)-2-(1-(2,2,2-trifluoretil)piperidin-4-il)benzo[d][1,3]dioxol-5-carboxamidă

Amestecul racemic 7-clor-2,4-dimetil-N-((6-metil-4-(metiltio)-2-oxo-1,2-dihidropiridin-3-il)metil)-2-(1-(2,2,2-trifluoretil)piperidin-4-il)benzo[d][1,3]dioxol-5-carboxamidă (289 mg) a fost separat prin SFC preparativă [Coloană: ChromegaChiral CC4 de la ES Industries (250 mm × 20 mm ID). Faza mobilă A: CO₂/Faza mobilă B: 0,25% izopropilamină în metanol. Izocratic (55% faza mobilă A și 45% faza mobilă B). Debit: 80 g/min. Temperatura coloanei: 25 °C]. Metoda analitică SFC: Coloană: Chiralcel OX-H de la Chiral Technologies (100 mm × 4,6 mm I.D.). Faza mobilă A: CO₂/Faza mobilă B: 0,1% izopropilamină în metanol. Izocratic (75% faza mobilă A și 25% faza mobilă B). Debit: 4 ml/min. Temperatura coloanei: 40 °C. Exemplul 16 (Enantiomer 1) (enantiomer/eutomer dorit): Timp de retenție = 3,74 min (metoda analitică SFC). Recuperare = 90 mg, 12% randament, 99% ee (solid galben). LCMS [M+H]⁺ m/z: calculat 560,2; găsit 560,2. ¹H RMN (400 MHz, Metanol-*d*₄) δ 6,89 (s, 1 H), 6,27 (s, 1 H), 4,49 (s, 2H), 3,08 - 2,98 (m, 4H), 2,52 (s, 3H), 2,34 (larg, *J* = 11,0 Hz, 2H), 2,29 (s, 3H), 2,20 (s, 3H), 1,93 - 1,84 (m, 1 H), 1,83 - 1,76 (m, 2H), 1,62 (s, 3H), 1,60 - 1,47 (m, 2H). Exemplul 16 (Enantiomer 2) (enantiomer/distomer nedorit): Timp de retenție = 4,25 min (metoda analitică SFC). Recuperare = 101 mg g, 13% randament, 98% ee, (solid galben). LCMS [M+H]⁺ m/z: calculat 560,2; găsit 560,2. ¹H RMN (400 MHz, Metanol-*d*₄) δ 6,89 (s, 1 H), 6,27 (s, 1 H), 4,49 (s, 2H), 3,08 - 2,98 (m, 4H), 2,52 (s, 3H), 2,34 (larg, *J* = 11,0 Hz, 2H), 2,29 (s, 3H), 2,20 (s, 3H), 1,93 - 1,84 (m, 1 H), 1,83 - 1,76 (m, 2H), 1,62 (s, 3H), 1,60 - 1,47 (m, 2H).

Exemplul 15: 7-clor-N-((4-clor-6-metil-2-oxo-1,2-dihidropiridin-3-il)metil)-2-(4-(3-metoxiazetidin-1-il)ciclohexil)-2,4-dimetilbenzo[d][1,3]dioxol-5-carboxamidă



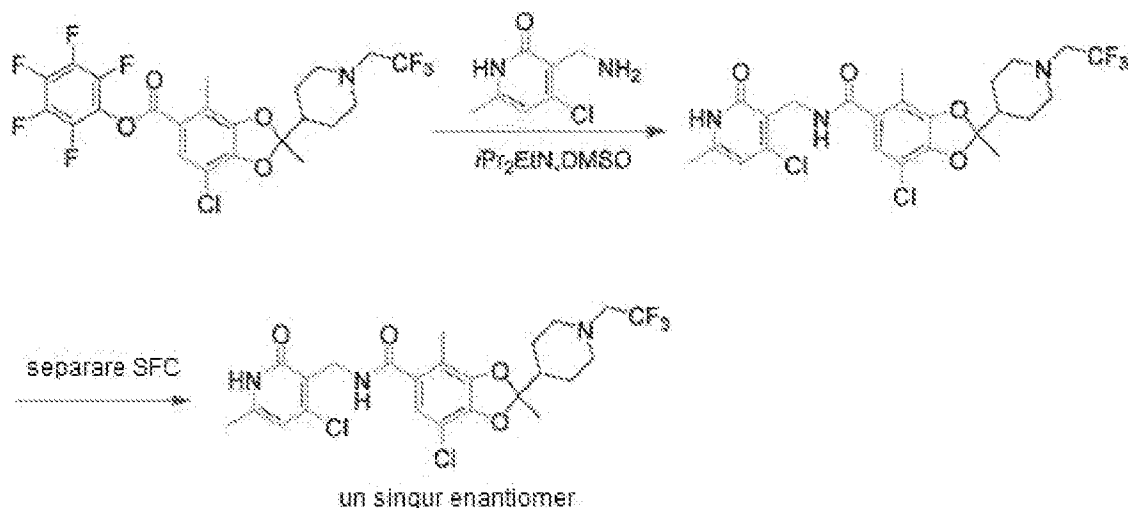
Intermediar 9

Exemplul 15

(un singur enantiomer; un singur izomer geometric) (un singur enantiomer; un singur izomer geometric)

La o soluție de acid 7-clor-2-(4-(3-metoxiazetidin-1-il)ciclohexil)-2,4-dimetilbenzo[d][1,3]dioxol-5-carboxilic (900 mg, 2,27 mmol) în N,N-dimetilformamidă (5 mL) s-au adăugat O-(7-azabenzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-hexafluorofosfat de tetrametiluroniu (1,04 g, 2,73 mmol) și N,N-diizopropiletilamină (2,38 mL, 13,6 mmol). Amestecul a fost agitat la 25°C timp de 30 de minute înainte de a fi adăugată 3-(aminometil)-4-clor-6-metil-1H-piridin-2-onă sare clorhidrat (Intermediarul 6) (710 mg, 3,4 mmol). Amestecul de reacție a fost agitat la temperatura camerei timp de încă 1,5 ore apoi filtrat. Filtratul a fost purificat prin HPLC preparativă de două ori [Coloană: YMC-Actus Triart C18 (100 mm × 30 mm, 5 μm). Faza mobilă A: apă (0,05% acid clorhidric)/Faza mobilă B: acetonitril. Gradient (85 până la 55% faza mobilă A/15 până la 45% faza mobilă B, timp de 10 min). Temperatura coloanei: 30 °C și Coloana: Xtimate C18 (150 mm × 25 mm, 5 μm). Faza mobilă A: apă (0,05% hidroxid de amoniac v/v)/Faza mobilă B: acetonitril. Gradient (69 până la 39% faza mobilă A/31 până la 61% faza mobilă B, timp de 7 min). Temperatura coloanei: 30°C] pentru a da compusul din titlu (533 mg, randament 43%, puritate >99%) ca un solid alb. LCMS [M+H]⁺ m/z: calculat 550,2; găsit 550,1. ¹H RMN (400 MHz, Cloroform-*d*) δ 11,97 (br, 1 H), 7,06 - 7,03 (m, 1 H), 6,88 (s, 1 H), 6,19 (s, 1 H), 4,65 (d, *J* = 6,0 Hz, 2 H), 4,05 - 4,01 (m, 1 H), 3,66 - 3,62 (m, 2H), 3,25 (s, 3H), 2,93 - 2,90 (m, 2H), 2,28 (s, 3H), 2,25 (s, 3H), 1,93 - 1,81 (m, 6H), 1,60 (s, 3H), 1,25 - 1,02 (m, 4H).

Exemplul 16: (R)-7-clor-N-((4-clor-6-metil-2-oxo-1,2-dihidropiridin-3-il)metil)-2,4-dimetil-2-(1-(2,2,2-trifluoretil)piperidin-4-il)benzo[d][1,3]dioxol-5-carboxamidă și (S)-7-clor-N-((4-clor-6-metil-2-oxo-1,2-dihidropiridin-3-il)metil)-2,4-dimetil-2-(1-(2,2,2-trifluoretil)piperidin-4-il)benzo[d][1,3]dioxol-5-carboxamidă



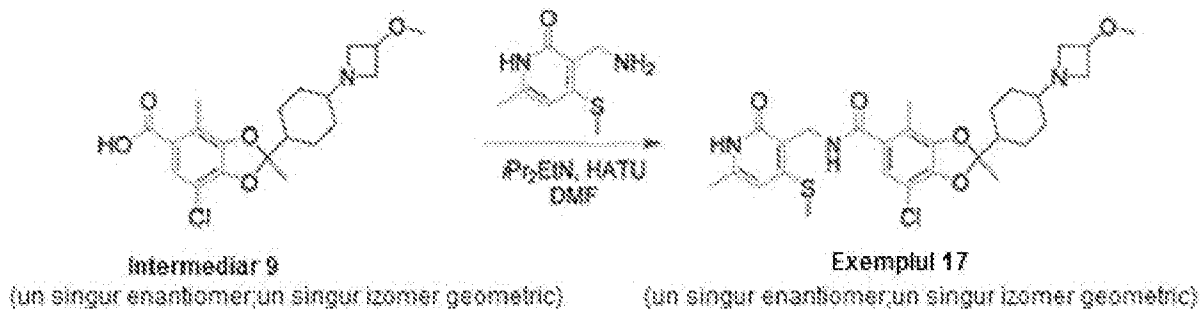
Etapă 1: Sinteza 7-clor-N-((4-clor-6-metil-2-oxo-1,2-dihidropiridin-3-il)metil)-2,4-dimetil-2-(1-(2,2,2-trifluoretil)piperidin-4-il)benzo[d][1,3] dioxol-5-carboxamidă

La o soluție de 2,3,4,5,6-pentafluorfenil 7-clor-2,4-dimetil-2-[1-(2,2,2-trifluoretil)piperidin-4-il]-2H-1,3-benzodioxol-5-carboxilat (Intermediar 8) (188 mg, 0,3358 mmol) în dimetilsulfoxid (1 mL) s-au adăugat 3-(aminometil)-4-clor-6-metil-1,2-dihidropiridin-2-onă sare clorhidrat (Intermediar 6) (70,2 mg, 0,336 mmol) și N,N-diizopropiletilamină (233 μ L, 1,34 mmol). Amestecul de reacție a fost încălzit la 60 °C și după 1 oră s-a adăugat pe o coloană C18 pentru purificare. Produsul dorit a fost purificat de două ori prin cromatografie rapidă în fază inversă (coloană C18, gradient 0 până la 100% acetonitril în apă cu 0,1% acid trifluoracetic) pentru a da compusul din titlu (180 mg, randament 98%) ca un amestec racemic sub formă de gumă.

Etapă 2: Separare (R)-7-clor-N-((4-clor-6-metil-2-oxo-1,2-dihidropiridin-3-il)metil)-2,4-dimetil-2-(1-(2,2,2-trifluoretil)piperidin-4-il)benzo[d][1,3]dioxol-5-carboxamidă și (S)-7-clor-N-((4-clor-6-metil-2-oxo-1,2-dihidropiridin-3-il)metil)-2,4-dimetil-2-(1-(2,2,2-trifluoretil)piperidin-4-il)benzo[d][1,3]dioxol-5-carboxamidă

Amestecul racemic 7-clor-N-((4-clor-6-metil-2-oxo-1,2-dihidropiridin-3-il)metil)-2,4-dimetil-2-(1-(2,2,2-trifluoretil)piperidin-4-il)benzo[d][1,3]dioxol-5-carboxamidă (180 mg) a fost dizolvată prin SFC preparativă [Coloană: ChromaChiral CC4 de la ES Industries (250 mm $\times$ 20 mm I.D.). Faza mobilă A: CO₂/Faza mobilă B: 0,25% izopropilamină în metanol. Izocratic (65% faza mobilă A și 35% faza mobilă B). Debit: 80 g/min. Temperatura coloanei: 25 °C]. Metoda analitică SFC: Coloană: Chiralcel OZ-H de la Chiral Technologies (100 mm $\times$ 4,6 mm I.D., xx μ m). Faza mobilă A: CO₂/Faza mobilă B: 0,1% izopropilamină în metanol. Izocratic (65% faza mobilă A și 35% faza mobilă B). Debit: 4 ml/min. Temperatura coloanei: 40 °C. Exemplul 17 (Enantiomer 1) (enantiomer/eutomer dorit): Timp de retenție = 0,73 min (metoda analitică SFC). Recuperare = 61 mg, 33% randament, 100% ee (solid galben). Exemplul 17 (Enantiomer 2) (enantiomer/distomer nedorit): Timp de retenție = 0,98 min (metoda analitică SFC). Recuperare = 63 mg, randament 34%, 97 ee, (solid galben). LCMS [M+H]⁺ m/z: calculat 548,1; găsit 548,2. ¹H RMN (400 MHz, Metanol-d₄) δ 6,89 (s, 1 H), 6,29 (s, 1 H), 4,52 (s, 2H), 3,04 (q, J= 9,8 Hz, 4H), 2,35 (br t, J = 11,0 Hz, H), 2,27 (s, 3H), 2,19 (s, 3H), 1,95 - 1,85 (m, 1 H), 1,85 - 1,75 (m, 2H), 1,63 (s, 3H), 1,62 - 1,50 (m, 2H).

Exemplul 17: 7-clor-2-(4-(3-metoxiazetidină-1-il)ciclohexil)-2,4-dimetil-N-((6-metil-4-(metiltio)-2-oxo-1,2-dihidropiridin-3-il)metil)benzo[d][1,3]dioxol-5-carboxamidă



La o soluție de acid 7-clor-2-(4-(3-metoxiazetidin-1-il)ciclohexil)-2,4-dimetilbenzo[d][1,3]dioxol-5-carboxilic (Intermediarul 9 - un singur enantiomer și izomer geometric) (5 g, 12,63 mmoli) în N,N-dimetilformamidă (50 ml) s-au adăugat O-(7-azabenzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-hexafluorofosfat de tetrametiluroni (5,7 g, 14,99 mmol) și N,N-diizopropiletilamină (11 mL, 63,15 mmol). Amestecul a fost agitat la 20 °C timp de 30 de minute înainte de a fi adăugată 3-(aminometil)-6-metil-4-(metiltio)piridin-2(1H)-onă sare clorhidrat (Intermediarul 1) (4,2 g, 19,03 mmoli). Amestecul de reacție a fost agitat la temperatura camerei timp de încă 1,5 ore apoi filtrat. Filtratul a fost purificat prin HPLC preparativă [Coloană: Phenomenex Gemini C18 (250 mm x 50 mm, 10 μm). Faza mobilă A: apă (hidroxid de amoniu 0,04% v/v și bicarbonat de amoniu 10 mM)/Faza mobilă B: acetonitril. Gradient (75 până la 44% faza mobilă A/25 până la 56% faza mobilă B, timp de 23 min). Temperatura coloanei: 30 °C] pentru a da compusul din titlu (4,4 g, randament 60%, puritate 96% ca solid alb. LCMS [M+H]⁺ m/z: calculat, 562,2; găsit 562,2. ¹H RMN (400 MHz, Metanol-d₄) δ 6,91 (s, 1 H), 6,29 (s, 1 H), 4,50 (s, 2 H), 4,01 (cvin., J = 6 Hz, 1 H), 3,58 (dd, J = 8,8, 6,4 Hz, 2H), 3,26 (s, 3H), 2,92 - 3,02 (m, 2H), 2,54 (s, 3H), 2,31 (s, 3H), 2,21 (s, 3H), 2,01 - 2,11 (m, 1 H), 1,79 - 2,00 (m, 5H), 1,62 (s, 3H), 1,19 - 1,34 (m, 2H), 0,91 - 1,08 (m, 2H).

Teste EZH2

Măsurători IC₅₀ pentru Inhibitori care Utilizează EZH2

Test biochimic EZH2 (IC₅₀): Activitățile compusului au fost evaluate prin încorporarea ³H-SAM într-o peptidă H3 biotinitată. În mod specific, 30 pM PRC2 care conține EZH2 în greutate (complex pentameric preparat intern) a fost pre-incubat cu 450 nM SAM, 450 nM ³H-SAM, μM peptidă activator H3K27me3 2 (H₂N-RKQLATKAAR(Kme3)SAPATGGVKKP-amidă) și compuși (ca titrări de răspuns la doză duplicat în 10 puncte în DMSO, test final 0,8% DMSO (v/v)) timp de 3-5 ore în 50 mM Tris (pH 8,5), 1 mM DTT, 0,07 mM Brij-35, 0,1% BSA și 0,8% DMSO într-un volum total de 12,5 μl. Reacția a fost inițiată cu peptida substrat H3 biotinitat (H₂N-RKQLATKAAR(Kme1)SAPATGGVKKP-NTPEGBiot) ca stoc de 2 μM în 12,5 μl tampon și lăsată să reacționeze la temperatura camerei timp de 18-22 ore. Stingerea a fost realizată prin adăugarea a 20 μl de soluție STOP (50 mM Tris (pH 8,5), 200 mM EDTA, 2 mM SAH). 35 μl de soluție stinsă au fost transferați pe FlashPlates acoperite cu streptavidină (PerkinElmer), incubate 1-2 ore, spălate și citite într-un cititor TopCount (PerkinElmer). Valorile IC₅₀ au fost calculate în Genedata Screener folosind corelări neliniare cu cel puțin patru parametri, unde cei patru parametri au fost IC₅₀, panta ascendentă, linia de bază pre-tranzițională (0% INH) și linia de bază post-tranzițională (100% INH).

Măsurători EC₅₀ pentru Inhibitori în Teste cu Celule HeLa

Testul H3K27me3 Alpha Hela (AlphaLISA). Zece doze diferite din fiecare compus de testat (într-o serie de diluții de trei ori) au fost placcate în plăci duplicat cu 384 de godeuri tratate cu cultură de țesut (Catalog # 6007680; Perkin Elmer, Waltham, MA). Celulele HeLa crescute în cultură au fost tripsinizate și numărate folosind un contor de celule Contess® (Catalog # C10281; Life Technologies, Grand Island, NY). Celulele au fost diluate la 67.000 de celule per ml în 10% DMEM (nr. catalog 10569-010 Life Technologies, Grand Island, NY) și 15 μL (1.000 de celule) au fost placcate în fiecare godeu folosind Selectorul Dozator Biotek MicroFlo™ (BioTek Instruments, Inc. Vermont, SUA) din placa cu 384 de godeuri. Plăcile au fost incubate la 37°C/5% CO₂ timp de 72 de ore. Una dintre plăcile duplicat a fost procesată pentru testarea HeLa, iar cealaltă pentru viabilitate. S-au adăugat 5 μL de tampon de liză Cell-Histone Lysis Buffer (1 X) (Catalog # AL009F1 Perkin Elmer; Waltham, MA) per godeu la placa procesată pentru AlphaLISA și placa a fost incubată la temperatura camerei timp de 30 de minute pe un agitator de plăci cu viteză mică (Model # 4625-Q Thermo Scientific, Waltham, MA). Apoi, s-au adăugat 10 μl per godeu tampon de Extraction Histone Buffer (număr de catalog AL009F2; Perkin Elmer; Waltham, MA) și placa a fost incubată în continuare la temperatura camerei timp de 20 de minute pe un agitator cu plăci cu viteză mică. Apoi, în fiecare godeu s-au adăugat 10 μl amestec 5 X de granule acceptor anti-K27me3 plus anticorp - Biotinylated

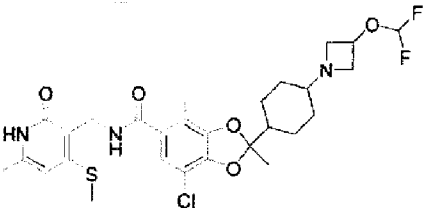
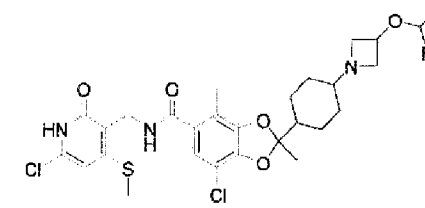
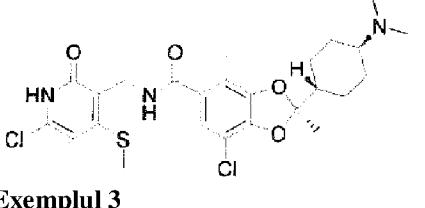
anti-Histone (C-ter) Anticorp (diluat până la 3 nM final) (Catalog #AL118 Perkin Elmer; Waltham, MA). Diluarea granulelor acceptor și a H3 anti-Histonă a fost realizată în tampon de detectare a histonelor - Histone Detector 1 X (Catalog # AL009F3 Perkin Elmer; Waltham, MA) care a fost produs prin diluarea stocului de 10 X furnizat. Placa a fost sigilată cu un dispozitiv de etanșare a plăcilor de aluminiu și incubată la 23°C timp de 60 de minute. Apoi, s-au adăugat 10 μ L soluție 5 X de granule donor de streptavidină - Streptavidin Donor (Catalog #6760002 Perkin Elmer; Waltham, MA) (20 μ g/mL final în tampon Histone Detection Buffer 1 X), = placa a fost sigilată cu dispozitiv de etanșare cu plăci de aluminiu și incubată la 23°C timp de 30 min. Plăcile au fost apoi citite folosind un cititor EnVision-Alpha Reader (model # 2104 Perkin Elmer; Waltham, MA).

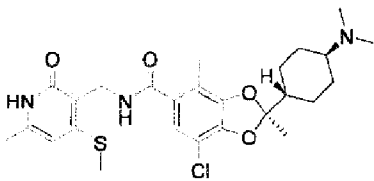
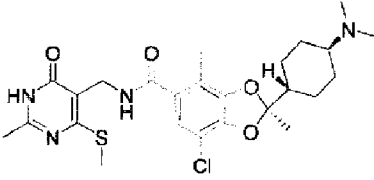
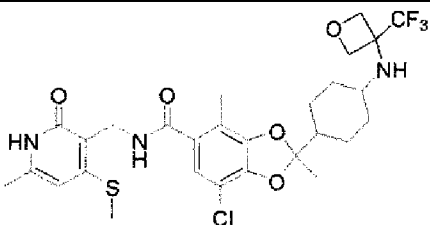
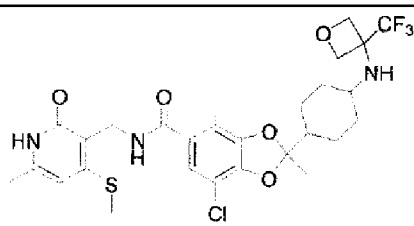
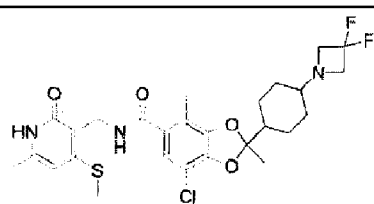
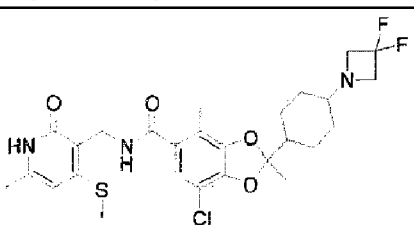
Viabilitatea celulară a fost testată prin adăugarea a 15 μ L de Cell Titer Glo ((Catalog #G9241 Promega Madison, WI) în fiecare godeu cu celule cu mediu. Plăcile au fost incubate la temperatura camerei timp de 15 - 20 minute pe un agitator de plăci la viteză mică. Plăcile au fost apoi citite folosind un cititor EnVision-Alpha (modelul # 2104 Perkin Elmer; Waltham, MA).

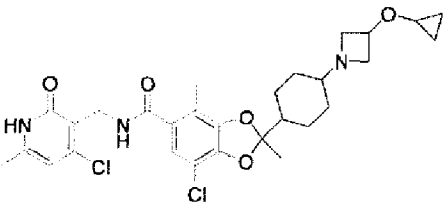
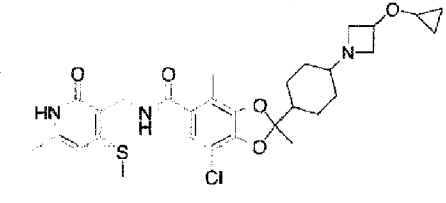
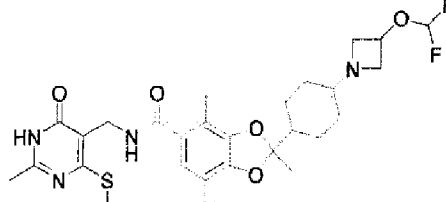
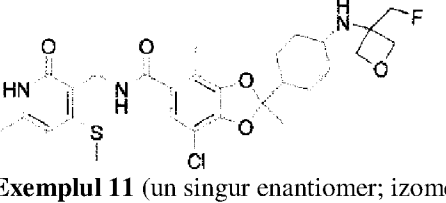
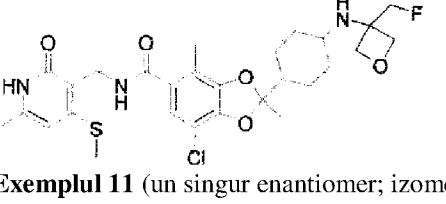
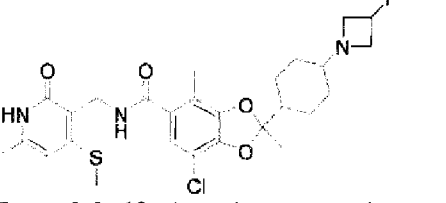
Măsurători GI_{50} pentru Inhibitori în Teste de Viabilitate Karpas-422

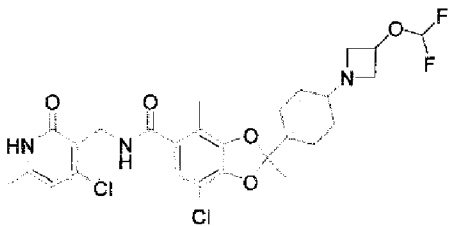
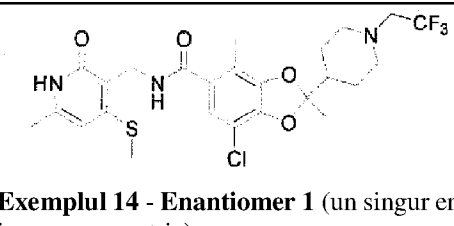
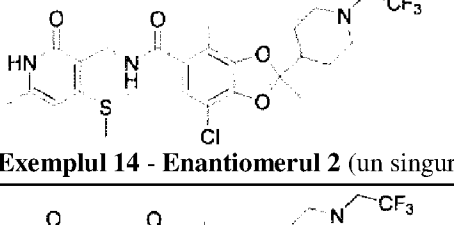
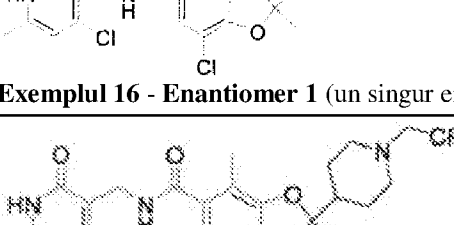
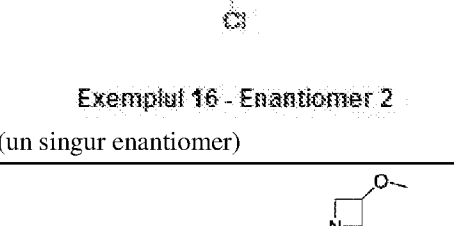
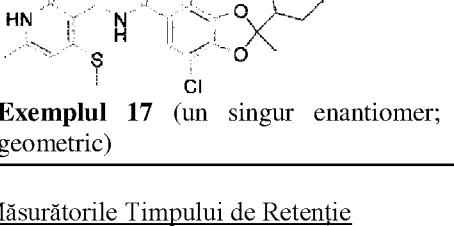
Liniile celulare Karpas-422 au fost obținute de la DSMZ (Braunschweig, Germania) și au fost crescute în mediu RPMI-1640. Toate mediile au conținut 10% ser fetal bovin (FBS) și 1% penicilină/streptomycină (Invitrogen). 20K celule per godeu au fost placcate pe plăci cu 96 de godeuri acoperite cu compus. Celulele au fost împărțite și însămânțate la densitatea inițială de placare (pe baza numărului de godeuri DMSO) la fiecare 4 zile în plăci care conțineau inhibitori proaspeți de EZH2. Numerele relative de celule au fost evaluate prin testul de viabilitate a celulelor luminescente Cell Titer-Glo (Promega) în ziua 8. GraphPad Prism 5 a fost utilizat pentru ajustarea curbei și valorile GI_{50} au fost raportate. Datele sunt prezentate în **Tabelul 5**.

Tabelul 5.

Exemplu	IC_{50} EZH2 (pM)	EC_{50} HeLa (nM)	GI_{50} Karpas-422 (nM)
 Exemplul 1 (un singur enantiomer, un singur izomer geometric)	91	0,52	3,9
 Exemplul 2 (un singur enantiomer; un singur izomer geometric)	1,500	15	250
 Exemplul 3	370	2,4	29

Exemplu	IC ₅₀ EZH2 (pM)	EC ₅₀ HeLa (nM)	GI ₅₀ Karpas-422 (nM)
 Exemplul 4 (enantiomer R; izomer geometric trans)	38	0,51	4,0
 Exemplul 5 (enantiomer R; izomer geometric trans)	54	3,6	22
 Exemplul 6 - Enantiomerul 1 (un singur enantiomer; un singur izomer geometric)	1,800	39	720
 Exemplul 6 - Enantiomerul 2 (un singur enantiomer; un singur izomer geometric)	140	4,2	53
 Exemplul 7 - Enantiomerul 1 (un singur enantiomer; un singur izomer geometric)	8,600		
 Exemplul 7 - Enantiomerul 2 (un singur enantiomer; un singur izomer geometric)	120		12

Exemplu	IC ₅₀ EZH2 (pM)	EC ₅₀ HeLa (nM)	GI ₅₀ Karpas-422 (nM)
 Exemplul 8 (un singur enantiomer; un singur izomer geometric)	39	0,52	5,0
 Exemplul 9 (un singur enantiomer; un singur izomer geometric)	54	0,61	3,7
 Exemplul 10 (un singur enantiomer; un singur izomer geometric)	202	1,9	20
 Exemplul 11 (un singur enantiomer; izomer geometric 1)	140	1,3	8,6
 Exemplul 11 (un singur enantiomer; izomer geometric 2)	180	1,7	
 Exemplul 12 (un singur enantiomer; un singur izomer geometric)	92	0,59	4,4

Exemplu	IC ₅₀ EZH2 (pM)	EC ₅₀ HeLa (nM)	GI ₅₀ Karpas-422 (nM)
 Exemplul 13 (un singur enantiomer; un singur izomer geometric)	84	0,81	9,7
 Exemplul 14 - Enantiomer 1 (un singur enantiomer; un singur izomer geometric)	37	1,4	
 Exemplul 14 - Enantiomerul 2 (un singur enantiomer)	7,000	210	
 Exemplul 16 - Enantiomer 1 (un singur enantiomer)	310	22	
 Exemplul 16 - Enantiomer 2 (un singur enantiomer)	> 10,000	>300	
 Exemplul 17 (un singur enantiomer; un singur izomer geometric)	43	0,33	3,5

Măsurătorile Timpului de Retenție

Testul timpului de retenție EZH2: Timpii de retenție ai compusului au fost evaluați prin monitorizarea recuperării activității enzimactice după o diluție de 100 de ori a complexului preformat de enzimă-inhibitor (reacție de diluare) și comparându-l cu activitatea unui control nediluat cu aceleași

concentrații finale ale tuturor reactivilor (reacție de control). Activitatea enzimatică a fost măsurată prin încorporarea ^3H -SAM într-o peptidă H3 biotinitată. Pentru reacția de diluare, PRC2 20 nM care conține EZH2 în greutate (complex pentameric preparat intern) a fost pre-incubat cu peptidă activator 1 μM (H_2N -RKQLATKAAR(Kme3)SAPATGGVKKP-amidă) și compus la 600 de ori valoarea sa K_i timp de 2 ore în 40 μL tampon (50 mM Tris pH 8,5, 4 mM DTT, 1 mM MgCl_2 , 0,07 mM Brij-35 și 0,1 mg/mL BSA), apoi s-a diluat de 100 de ori și reacția a fost inițiată prin transferul a 1,4 μL la un volum de 138,6 μL de tampon care conține 1 μM peptidă activator, 5,05 μM peptidă substrat (H_2N -RKQLATKAARKSAPATGGVKKP-NTPEGbiot), 1,01 μM SAM și 1,01 μM ^3H -SAM. Pentru reacția de control, 0,202 nM PRC2 a fost pre-incubat cu 1 pM peptidă activator, 1,01 pM SAM, 1,01 μM ^3H -SAM și compus la 6,06 ori K_i -ul său timp de 2 ore în 138,6 μL de tampon, apoi reacția a fost inițiată prin adăugarea a 1,4 μE 500 μM peptidă substrat în apă. Reacțiile au fost stinse la diferite momente de timp care se întind până la 10 ore, prin transferarea alicotelor de 8 μL din vasul de reacție pe o placă care conține 8 μL per godeu de soluție STOP (50 mM Tris pH 8,5, 200 mM EDTA, 2 mM SAH). După ultimul moment de timp, 12 μL soluții stinse au fost transferate pe o placă FlashPlate acoperită cu streptavidină (PerkinElmer) care conține 40 μL per godeu de soluție STOP, incubate 1-8 ore, spălate și citite într-un cititor de plăci TopCount (PerkinElmer).

A fost folosit un script personalizat pentru a corela datele de control privind progresul reacției la o linie dreaptă și datele de progres al reacției de diluare:

$$y = v_s t + \frac{v_i - v_s}{k_{obs}} (1 - e^{-k_{obs} t}) + \text{fond}$$

Unde y este produsul format, t este timpul de reacție, v_i este viteza inițială, v_s este viteza în regim de echilibru și k_{obs} este constanta de viteză pentru trecerea de la faza de viteză inițială a curbei la faza de viteză în regim de echilibru a curbei. În ajustarea datelor de progres a reacției de diluare, v_s a fost constrâns la panta liniei adaptate la datele de progres a reacției de control. Valoarea corelată a k_{obs} a fost apoi transformată în timp de retenție:

$$\tau = \frac{[EI] - \frac{1}{K_i} [E][I]}{k_{obs}[EI]}$$

Unde τ este timpul de retenție, K_i este constanta de inhibiție, $[EI]$ este concentrația de echilibru calculată a complexului enzimă-inhibitor, $[E]$ este concentrația de echilibru calculată a enzimei libere și $[I]$ este concentrația de echilibru calculată a inhibitorului liber.

Măsurători de Permeabilitate Celulară pentru Inhibitori în Testul MDCK

Cultură de celule: Celulele MDCK II (obținute de la Piet Borst de la Netherlands Cancer Institute) au fost însemănțate pe membrane de polietilenă (PET) în sisteme de inserție BD cu 96 de godeuri la $2,5 \times 10^5$ celule/mL până la 4-7 zile pentru formarea monostratului de celule confluențe.

Procedura experimentală: Compușii de testare și de referință (nadolol, metoprolol și digoxină) au fost diluați cu tampon de transport (HBSS cu 10 mM Hepes, pH 7,4) din soluția stoc la o concentrație de 2 μM (<1% DMSO) și aplicați pe partea apicală (A) sau partea bazolaterală (B) a monostratului celular. Permeabilitatea compușilor de testat din direcția A la B sau B la A a fost determinată în duplicat cu inhibitor P-gp (GF120918, 10 μM). Digoxina a fost testată și la 10 μM din direcția A la B sau B la A cu/fără inhibitor P-gp (GF120918, 10 μM), în timp ce nadolol și metoprolol au fost testate la 2 μM în direcția A la B fără inhibitor P-gp (GF120918, 10 μM) în duplicat. Placa a fost incubată timp de 2,5 ore în incubator CO_2 la $37 \pm 1^\circ\text{C}$, cu 5% CO_2 la umiditate saturată fără agitare. În plus, a fost determinat și raportul de eflux al fiecărui compus. Compușii de testare și de referință au fost cuantificați prin analiză LC/MS/MS pe baza raportului aria de vârf analit/IS. După testul de transport, testul de respingere a Galbenului Lucifer este aplicat pentru a determina integritatea monostratului celular. Tamponurile sunt îndepărtate din ambele camere apicale și bazolaterale, urmate de adăugarea a 75 μL Galben Lucifer 100 μM în tampon de transport și a 250 μL tampon de transport în camerele apicale și, respectiv, bazolaterale. Placa este incubată timp de 30 de minute la 37°C cu 5% CO_2 și 95% umiditate relativă fără agitare. După 30 de minute de incubare, se prelevează 20 μL probe de Galben Lucifer din părțile apicale, urmate de adăugarea a 60 μL de tampon de transport. Și apoi se prelevează 80 μL probe de Galben Lucifer din părțile bazolaterale. Unitatea de fluorescență relativă (RFU) a Galbenului Lucifer este măsurată la 425/528 nm (excitație/emisie) cu un cititor de plăci Molecular Device M2e.

Analiza datelor: Coeficientul de permeabilitate aparent P_{ap} (cm/s) a fost calculat folosind ecuația:

$$P_{ap} = (dC/dt) \times V_r / (A \times C_0)$$

Unde dC_r/dt este concentrația cumulativă de compus în camera receptorului în funcție de timp ($\mu\text{M/s}$); V_r este volumul soluției din camera receptor (0,075 mL pe partea apicală, 0,25 mL pe partea bazolaterală); A este suprafața pentru transport, adică 0,0804 cm^2 pentru suprafața monostratului; C_0 este concentrația inițială în camera donor (μM).

- 5 Raportul de eflux a fost calculat folosind ecuația:

$$\text{Raport Eflux} = P_{sp}(\text{BA})/P_{sp}(\text{AB})$$

Recuperarea procentuală a fost calculată folosind ecuația:

$$\% \text{Recuperare} = 100 \times [(V_d \times C_r) + (V_d \times C_d)] / (V_d \times C_0)$$

- 10 Unde V_d este volumul din camerele donor (0,075 mL pe partea apicală, 0,25 mL pe partea bazolaterală); C_d și C_r sunt concentrațiile finale ale compusului de transport în camerele donor și, respectiv, receptor.

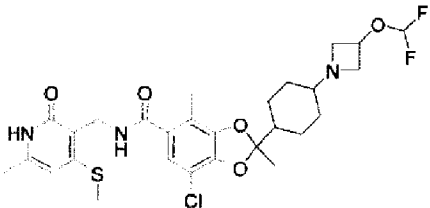
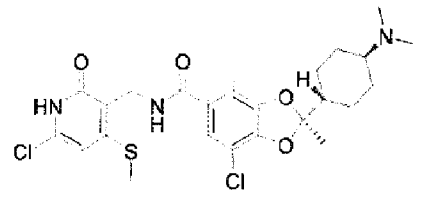
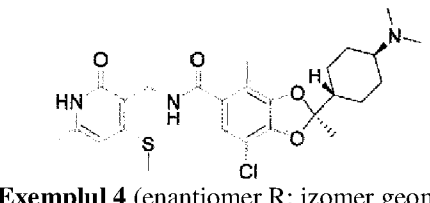
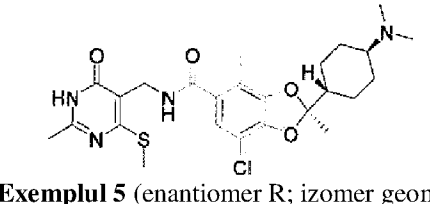
Procentul de Galben Lucifer din godeul bazolateral este calculat folosind ecuația:

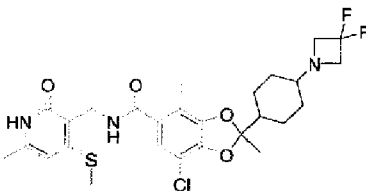
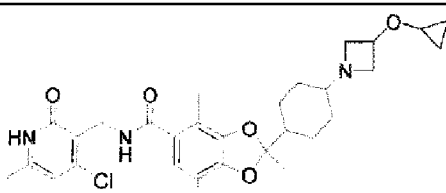
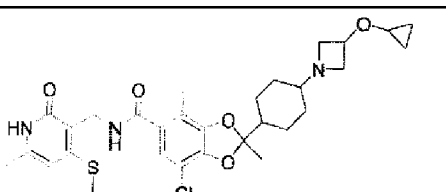
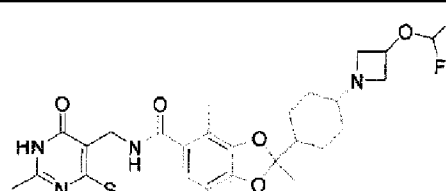
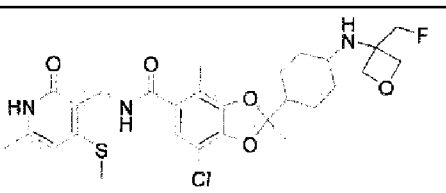
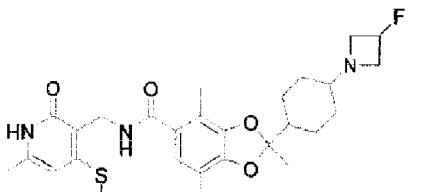
$$\% \text{Galben Lucifer} = \frac{V_{\text{Bazolateral}} \times \text{RFU}_{\text{Bazolateral}}}{V_{\text{Apical}} \times \text{RFU}_{\text{Apical}} + V_{\text{Bazolateral}} \times \text{RFU}_{\text{Bazolateral}}} \times 100$$

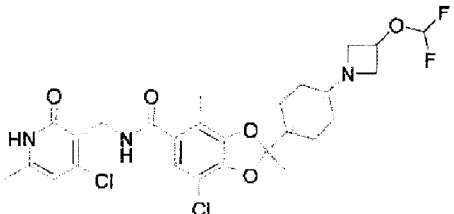
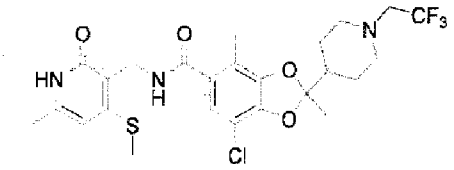
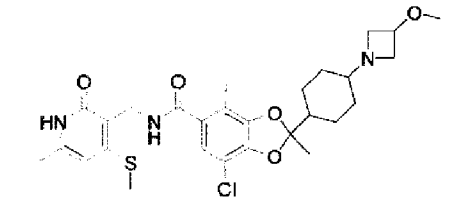
unde $\text{RFU}_{\text{Apical}}$ și $\text{RFU}_{\text{Bazolateral}}$ sunt valorile relative ale unității de fluorescență ale Galbenului Lucifer în godeurile apicale și, respectiv, bazolaterale; V_{Apical} și $V_{\text{Bazolateral}}$ sunt volumul godeurilor apicale și bazolaterale (0,075 mL și, respectiv, 0,25 mL). Procentul de Galben Lucifer ar trebui să fie mai mic de 2. Datele sunt prezentate în **Tabelul 6**.

15

Tabelul 6

Exemplu	Timp de retenție EZH2 (ore)	Permeabilitate celulară (10^{-6} cm/s)/ Raport de Eflux
 Exemplul 1 (un singur enantiomer, un singur izomer geometric)	>100	5,6/0,79
 Exemplul 3		3,7/1,2
 Exemplul 4 (enantiomer R; izomer geometric trans)		0,62/2,3
 Exemplul 5 (enantiomer R; izomer geometric trans)		1,1/3,6

Exemplu	Timp de retenție EZH2 (ore)	Permeabilitate celulară (10^{-6} cm/s)/ Raport de Eflux
 Exemplul 7 - Enantiomer 2 (un singur enantiomer; un singur izomer geometric)	33	12/0,71
 Exemplul 8 (un singur enantiomer; un singur izomer geometric)	>100	6,1/0,9
 Exemplul 9 (un singur enantiomer; un singur izomer geometric)	>100	3,8/1,4
 Exemplul 10 (un singur enantiomer; un singur izomer geometric)	37	6,5/0,69
 Exemplul 11 (un singur enantiomer; izomer geometric 1)		5,3/1,3
 Exemplul 12 (un singur enantiomer; un singur izomer geometric)	>100	6,3/1,2

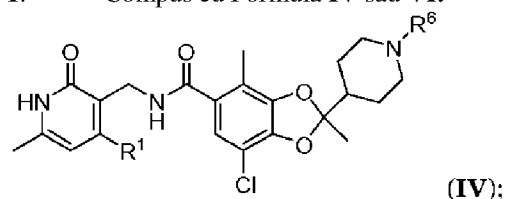
Exemplu	Timp de retenție EZH2 (ore)	Permeabilitate celulară (10 ⁻⁶ cm/s)/ Raport de Eflux
 Exemplul 13 (un singur enantiomer; un singur izomer geometric)	48	8,9/0,64
 Exemplul 14 - Enantiomer 2 (un singur enantiomer)		13/0,56
 Exemplul 17 (un singur enantiomer; un singur izomer geometric)	>100	2,5/1,8

(56) Referințe bibliografice citate în raportul de documentare:

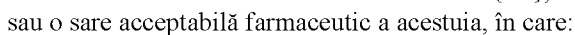
- PRIYANKA L GAIKWAD ET AL: "The Use of Bioisosterism in Drug Design and Molecular Modification", AMERICAN JOURNAL OF PHARMTECH RESEARCH AM. J. PHARMTECH RES, vol. 2, no. 4, 1 January 2012 (2012-01-01) , pages 1-23, XP055567975,
- US-A1- 2017 073 335
- VENKATESAN N.: "BIOISOTERISM REVIEW- AN BIOLOGICAL MODIFICATION", WORLD JOURNAL OF PHARMACY AND PHARMACEUTICAL SCIENCES, 1 September 2017 (2017-09-01), pages 1918-1949, XP055603429, DOI: 10.20959/wjpps20179-10126

(57) Revendicări:

1. Compus cu Formula **IV** sau **VI**:



sau



R¹ este -SCH₃¹ sau clor;

X este CH;

R^a este hidrogen, (C₁-C₄)alchil sau halo(C₁-C₄)alchil;

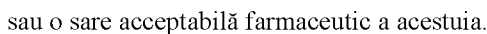
R^b este (C₁-C₄)alchil, halo(C₁-C₄)alchil sau heterocicilul cu 4-7 membri, în care respectivul ciclu heterocicil este opțional substituit cu 1 până la 3 grupări selectate dintre halogen, (C₁-C₄)alchil, halo(C₁-C₄)alchil, (C₁-C₄)alcoxi și halo(C₁-C₄)alcoxi; sau

R^a și R^b împreună cu atomul de azot la care sunt atașați formează un heterociclic cu 4-7 membri opțional substituit cu 1 până la 3 grupări selectate dintre halogen, (C₁-C₄)alchil, halo(C₁-C₄)alchil și -OR^c;

R^c este (C₁-C₄)alchil, halo(C₁-C₄)alchil sau (C₃-C₇)cicloalchil;

R⁶ este halo (C₁-C₄)alchil.

2. Compus conform Revendicării 1, în care compusul are Formula:

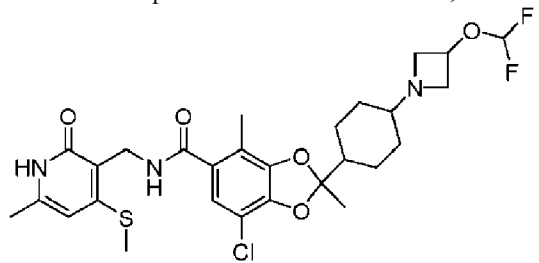


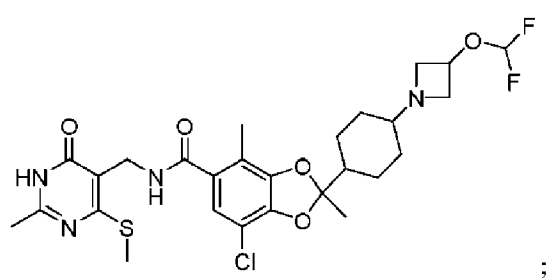
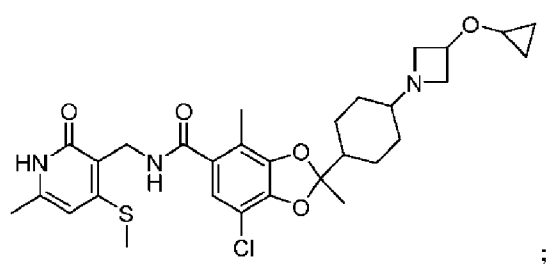
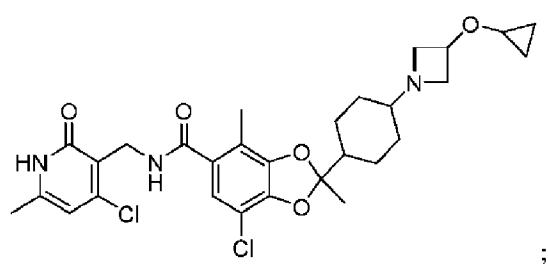
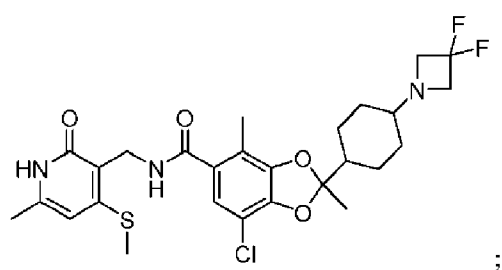
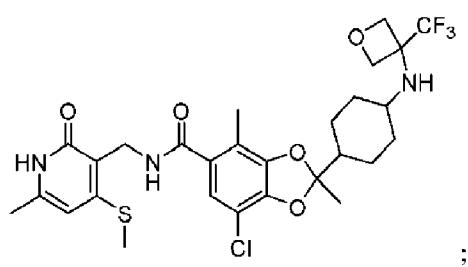
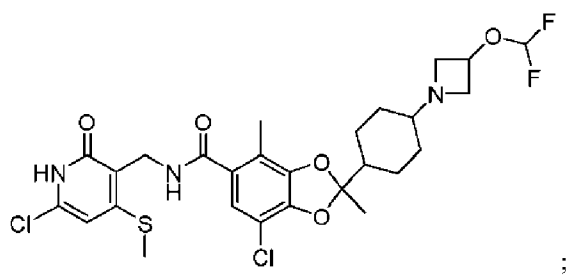
3. Compus conform oricăreia dintre Revendicările 1 sau 2, în care R^b este (C₁-C₄)alchil sau oxetanol, în care respectiva grupare oxetanol este opțional substituită cu halo(C₁-C₄)alchil; sau R^a și R^b împreună cu atomul de azot la care sunt atașați formează un azetidinil opțional substituit cu halogen sau -OR^c.

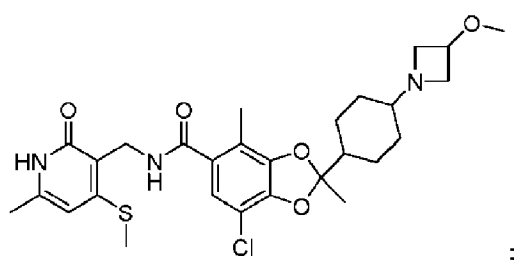
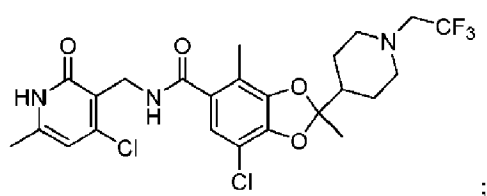
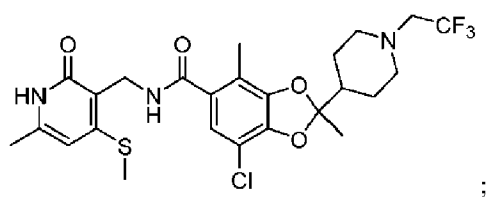
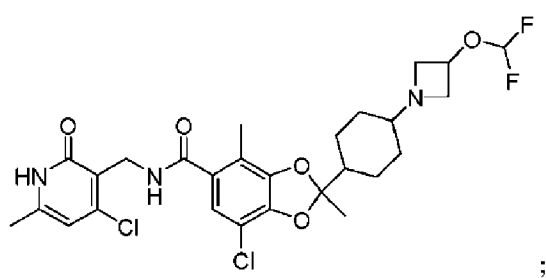
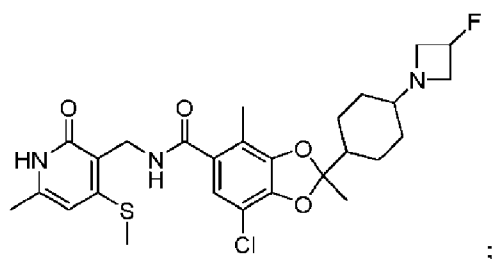
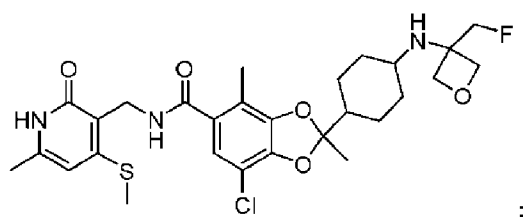
4. Compus conform oricăreia dintre Revendicăările de la 1 până la 3, în care R^a este hidrogen sau metil; și R^b este metil sau oxatanil, în care respectiva grupare oxetanil este opțional substituită cu -CH₂F sau -CF₃.

5. Compus conform oricăreia dintre Revendicările de la 1 până la 4, în care R^a și R^b împreună cu atomul de azot la care sunt atașați formează un azetidină opțional substituit cu 1 până la 2 atomi de fluor sau -OR^c; și R^c este -CH₃, -CHF₂, sau ciclopropil.

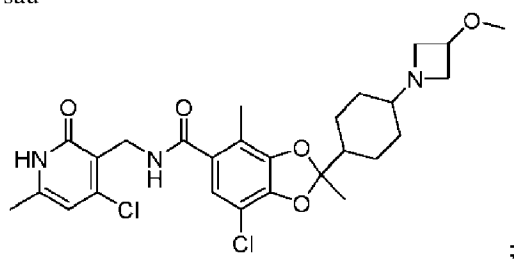
6. Compus conform Revendicării 1, în care compusul are Formula:





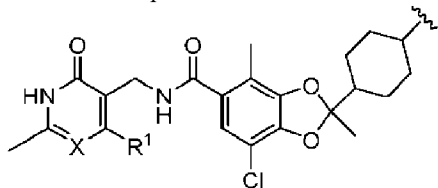


sau



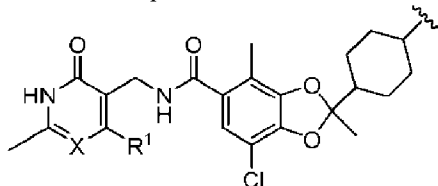
sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia.

7. Compus conform oricăreia dintre Revendicările de la 1 până la 6, în care gruparea



și NR^aR^b sunt orientate în poziția trans în jurul ciclului ciclohexil.

8. Compus conform oricăreia dintre Revendicările de la 1 până la 6, în care gruparea

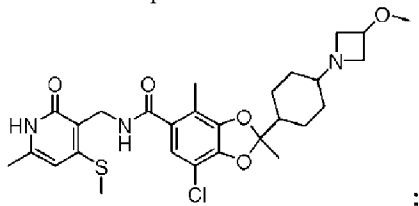


și NR^aR^b sunt orientate în poziția cis în jurul ciclului ciclohexil.

9. Compus conform oricăreia dintre Revendicările de la 1 până la 8, în care configurația stereochemică a centrului chiral al grupării 1,3-dioxolanil este R.

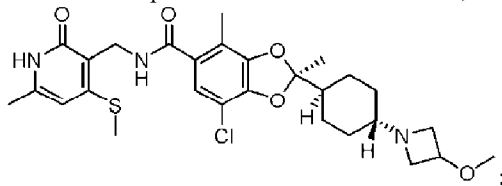
10. Compus conform oricăreia dintre Revendicările de la 1 până la 8, în care configurația stereochemică a centrului chiral al grupării 1,3-dioxolanil este S.

11. Compus conform Revendicării 1, în care compusul are Formula:



sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia.

12. Compus conform Revendicării 11, în care compusul are Formula:



sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia.

13. Compoziție farmaceutică cuprinzând compusul conform oricăreia dintre Revendicările de la 1 până la 12, sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia; și un purtător acceptabil farmaceutic.

14. Compus conform oricăreia dintre Revendicările de la 1 până la 12, sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia, pentru utilizare în tratamentul cancerului la un subiect.

15. Compus pentru utilizare conform Revendicării 14, în care cancerul este selectat dintre cancer mamar, cancer de prostată, cancer de colon, carcinom cu celule renale, cancer glioblastom multiform, cancer de vezică urinară, melanom, cancer bronșic, limfom, colangiosarcom, mielom multiplu, cancer pulmonar, cancer ovarian și cancer hepatic.